



TUGAS AKHIR - SB-141510

# UJI IN-VITRO SENYAWA ANTIKANKER TRISINDOLINA-4 TERHADAP INDEKS FAGOSITOSIS SEL MAKROFAG MENCIT (*Mus musculus*)

Zulfina Qurotul Aini  
01311440000013

Dosen Pembimbing:  
Dr. rer. nat. Edwin Setiawan, M.Sc  
Prof. Mardi Santoso, Ph. D

DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS ILMU ALAM  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2018



TUGAS AKHIR - 141510

**UJI *IN-VITRO* SENYAWA ANTIKANKER  
TRISINDOLINA-4 TERHADAP INDEKS  
FAGOSITOSIS SEL MAKROFAG MENCIT (*Mus  
musculus*)**

ZULFINA QUROTUL AINI  
0131140000013

Dosen Pembimbing  
Dr. rer. nat. Edwin Setiawan, M.Sc  
Prof. Mardi Santoso, Ph.D

DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS ILMU ALAM  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2018



FINAL PROJECT - SB-141510

***IN-VITRO* ASSAY OF TRISINDOLINE-4  
ANTICANCER COMPOUND TO PHAGOCYTIC  
INDEX OF MICE (*Mus musculus*)  
MACROPHAGE CELLS**

ZULFINA QUROTUL AINI  
013114000013

Supervisor  
Dr. rer. nat. Edwin Setiawan, M.Sc  
Prof. Mardi Santoso, Ph.D

DEPARTMENT OF BIOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2018

## LEMBAR PENGESAHAN

### UJI *IN VITRO* SENYAWA ANTIKANKER TRISINDOLINA-4 TERHADAP INDEKS FAGOSITOSIS SEL MAKROFAG MENCIT (*Mus musculus*)

#### TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains  
pada  
Departemen S-1 Biologi  
Fakultas Ilmu Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

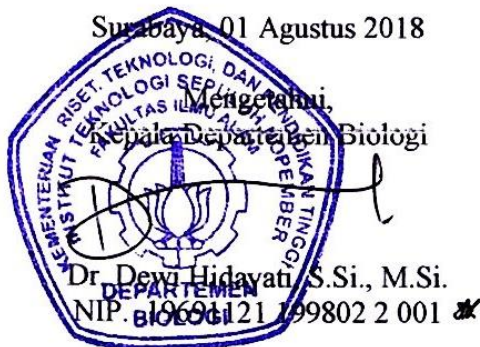
**ZULFINA QUROTUL AINI**  
**NRP. 01311440000013**

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir :

Dr. rer. nat. Edwin Setiawan, M.Sc. .... (Pembimbing 1)

Prof. Mardi Santoso, Ph.D. .... (Pembimbing 2)

Surabaya, 01 Agustus 2018



**UJI *IN-VITRO* SENYAWA ANTIKANKER TRISINDOLINA-4  
TERHADAP INDEKS FAGOSITOSIS SEL MAKROFAG  
MENCIT (*Mus musculus*)**

**Nama : Zulфина Qurotul Aini**  
**NRP : 01311440000013**  
**Jurusan : Biologi**  
**Dosen Pembimbing : Dr. rer. nat. Edwin Setiawan, M.Sc**  
**Prof. Mardi Santoso, Ph.D**

**Abstrak**

*Studi terdahulu telah diketahui bahwa mekanisme dari obat yang digunakan dalam terapi pengobatan kanker merupakan senyawa-senyawa yang mempunyai kemampuan untuk menginisiasi kematian sel kanker. Salah satu senyawa yang digunakan dalam kemoterapi yaitu doxorubicin tidak mempunyai kemampuan untuk melakukan targeting secara spesifik hanya pada sel kanker dan bersifat immunosupresif sehingga studi terbaru yang dilakukan saat ini lebih berfokus pada senyawa bahan alam untuk dimanfaatkan sebagai agen antikanker salah satunya adalah senyawa trisindolina-4. Proses pemanfaatannya, senyawa trisindolina-4 harus melalui beberapa pengujian termasuk uji sitotoksitas dan uji indeks fagositosis.*

*Uji in-vitro dilakukan dengan menambahkan senyawa trisindolina-4 pada kultur makrofag dengan konsentrasi senyawa uji 100, 50, 25, 12,5 dan 6,25 (mg/ml). Kemudian dilakukan uji fagositosis dengan latex beads dan dihitung indeks fagositosis dan kapasitas fagositosis sel makrofag. Berdasarkan penelitian ini, senyawa trisindolina-4 dapat meningkatkan aktivitas fagositosis yang meliputi nilai indeks dan kapasitas fagositosis sel makrofag *M. musculus*. Hasil aktivitas fagositosis terbaik didapatkan pada perlakuan trisindolina-4 25 mg/ml.*  
*Kata kunci : apoptosis, fagositosis, makrofag, trisindolina-4*

IN-VITRO STUDY OF PHAGOCYTIC INDEX OF  
ANTICANCER COMPOUND TRISINDOLINE-4 OF *Mus*  
*musculus* MACROPHAGE

**Name** : Zulfina Qurotul Aini  
**NRP** : 01311440000013  
**Department** : Biology  
**Supervisor** : Dr. rer. nat. Edwin Setiawan, M. Sc  
Prof. Mardi Santoso, Ph.D

Abstract

Previous study mentioned that the mechanism of the drug used in cancer treatment therapy is compounds that have the ability to initiate cancer cell death. One of the compounds used in chemotherapy, doxorubicin, does not have the ability to target specifically only cancer cells and has immunosuppressive impact to immune system, so recent studies have focused more on natural compounds to be used as anticancer agents, one of which is the trisindoline-4 compound. In the process of utilization, the trisindoline-4 compound must undergo several tests including cytotoxicity test and phagocytic activity measurement.

In-vitro study of phagocytic activity were performed by adding trisindoline-4 compounds to macrophage cultures with concentrations of 100, 50, 25.5 and 6.25 (mg/ml). A phagocytosis test was performed with latex beads then phagocytic activity of macrophage cell of *M. musculus* by calculating phagocytic index and phagocytic capacity. The result showed that trisindoline-4 compound can increase macrophage cell phagocytic activity of macrophage cells of *M. musculus* in trisindoline-4 with concentration of the compound was 25 mg/ml.

Keywords: apoptosis, phagocytosis, macrophages, trisindolina-4

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas berkat dan hikmat yang diberikan, penulis dapat menyelesaikan laporan tugas akhir dengan judul “Uji In-vitro Senyawa Antikanker Trisindolina-4 terhadap Indeks Fagositosis Sel Makrofag Mencit (*Mus musculus*)”, sebagai salah satu syarat kelulusan mata kuliah Tugas Akhir pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. Penulis mendapatkan banyak sekali doa dan bantuan dari berbagai pihak dalam menyelesaikan laporan Tugas Akhir ini. Atas berbagai bantuan dan dukungan tersebut, pada kesempatan ini penulis menghaturkan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Tuhan Yang Maha Esa, yang telah memberikan kesempatan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan Tugas Akhir hingga selesai. Kedua orangtua yang tak henti-hentinya memberikan semangat dan kasih sayang yang luar biasa kepada penulis.
2. Ibu Wirdhatul Muslihatin S.Si., M.Si., selaku dosen penguji I, ibu Dr. Awik Puji Dyah N., S.Si., M.Si. selaku dosen penguji II, Dr. rer. nat. Edwin Setiawan, M.Sc, dan Prof. Mardi Santoso, Ph. D selaku dosen pembimbing, yang telah memberikan ilmu, waktu berbagi dan nasihat dalam proses pengerjaan Tugas Akhir.
3. Teman-teman biologi angkatan 2014, dan semua pihak yang telah membantu penulis untuk menyelesaikan tugas akhir.

Surabaya, Juli 2018

Zulfina Qurotul Aini

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
ABSTRAK .....	iv
ABSTRACT .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
BAB I .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Permasalahan .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan .....	3
1.5 Manfaat .....	3
BAB II .....	5
2.1 Kanker.....	5
2.2 Kematian sel .....	5
2.2.1 Apoptosis .....	6
2.2.1.1 Caspase .....	10
2.2.1.2 Bcl Family protein .....	11
2.2.2 Nekrosis .....	11
2.2.3 Nekroptosis .....	12
2.2.4 Piroptosis .....	13
2.2.5 Autofagi .....	14
2.3 Fagositosis .....	14
2.3.1 Sel-sel fagositik .....	15
2.3.2 Makrofag .....	15
2.3.3 Perkembangan sel makrofag .....	18
2.3.4 Aktivasi makrofag .....	19
2.3.5 Fagositosis pada badan apoptotik .....	19
2.3.5.1 Mouse peritoneal macrophage .....	22



2.3.6	Indeks Fagositosis .....	22
2.3.7	Kapasitas fagositosis .....	23
2.3.8	<i>Latex beads</i> .....	23
2.4	Pengobatan kanker .....	23
2.4.1	Doxorubicin .....	23
2.4.2	Senyawa trisindolina-4 .....	25
BAB III	.....	27
3.1	Waktu dan tempat penelitian .....	27
3.2	Metode penelitian .....	27
3.2.1	Aklimatisasi <i>Mus musculus</i> .....	27
3.2.2	Isolasi kultur makrofag .....	27
3.2.3	Uji fagositosis pada latex beads .....	28
3.2.4	Orientasi konsentrasi uji .....	29
3.2.5	Rancangan penelitian dan analisis data .....	29
BAB IV	.....	31
4.1	Morfologi sel makrofag <i>M. musculus</i> perlakuan trisindolina-4 .....	31
4.2	Morfologi sel makrofag <i>M. musculus</i> perlakuan doxorubicin .....	33
4.3	Pengukuran dan uji aktivitas fagositosis sel makrofag ....	34
4.3.1	Kapasitas fagositosis .....	35
4.3.2	Indeks fagositosis .....	35
BAB V	.....	41
5.1	Kesimpulan .....	41
5.2	Saran .....	41
DAFTAR PUSTAKA	.....	43
LAMPIRAN	.....	59
BIODATA PENULIS	.....	71

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Kematian sel .....	5
Gambar 2.2	Mekanisme apoptosis .....	7
Gambar 2.3	Mekanisme intrinsik dan ekstrinsik apoptosis .....	10
Gambar 2.4	Mekanisme nekrosis .....	12
Gambar 2.5	Piroptosis .....	14
Gambar 2.6	Makrofag dan reseptor pada plasma membrannya .....	17
Gambar 2.7	Perkembangan sel makrofag dari monosit .....	18
Gambar 2.8	Proses inflamasi dan rekrutmen makrofag .....	19
Gambar 2.9	Proses fagositosis oleh makrofag .....	21
Gambar 2.10	Struktur kimia doxorubicin .....	24
Gambar 2.11	Mekanisme doxorubicin .....	21
Gambar 2.12	Struktur kimia senyawa trisindolina-4 .....	26
Gambar 4.1	Morfologi makrofag perlakuan trisindolina-4 .....	32
Gambar 4.2	Morfologi makrofag perlakuan doxorubicin .....	33
Gambar 4.3	Indirubin .....	40
Gambar 4.4	AhR signaling .....	40

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Kapasitas fagositosis sel makrofag setelah perlakuan .....	35
Tabel 4.2	Indeks fagositosis sel makrofag setelah perlakuan .....	36
Tabel 4.3	Rasio antara indeks dan kapasitas fagositosis makrofag .....	37

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Komposisi medium RPMI .....	59
Lampiran 2.	Desain uji fagositosis trisindolina-4 dan doxorubicin .....	60
Lampiran 3.	Perhitungan pengenceran senyawa .....	61
Lampiran 4.	Proses pengenceran senyawa .....	62
Lampiran 5.	Alat, bahan dan cara kerja .....	62
Lampiran 6.	Cara menghitung kepadatan sel makrofag .....	64
Lampiran 7.	Tabel hasil uji ANOVA kapasitas dan indeks fagositosis sel makrofag <i>M. musculus</i> perlakuan trisindolina-4 .....	65
Lampiran 8.	Tabel hasil uji ANOVA kapasitas dan indeks fagositosis sel makrofag <i>M. musculus</i> perlakuan doxorubicin .....	65
Lampiran 9.	Hasil uji Tukey nilai kapasitas fagositosis sel makrofag perlakuan trisindolina-4 .....	66
Lampiran 10.	Hasil uji Tukey nilai indeks fagositosis sel makrofag perlakuan trisindolina-4 .....	66
Lampiran 11.	Hasil uji Tukey nilai kapasitas fagositosis sel makrofag perlakuan doxorubicin .....	67
Lampiran 12.	Hasil uji Tukey nilai indeks fagositosis sel makrofag perlakuan doxorubicin .....	67
Lampiran 13.	Ethical clearance penelitian di Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada .....	68

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan kondisi patologi yang disebabkan oleh pembelahan sel secara terus menerus secara tidak terkendali (Meier *et al.*, 2000). Kanker berkembang dari sel-sel yang mengalami pembelahan terus menerus kemudian membentuk massa tumor primer yang kemudian dapat mengalami metastasis dan menyebar ke bagian tubuh lain melalui pembuluh darah. Beberapa tipe kanker yang menjadi penyebab utama kematian yang diakibatkan oleh kanker adalah kanker paru-paru, kanker pada kolon, kanker pada liver dan kanker payudara (Gibbs *et al.*, 1994), sehingga dilakukan beberapa upaya pengobatan terhadap kanker seperti terapi antihormonal, kemoterapi dengan menggunakan *anthracycline agent* seperti doxorubicin, inhibisi pada tirosin kinase, targeting pada Bcl-Abr fusi protein, targeting pada reseptor epidermal growth factor (EGFR) dan targeting HER-2 (Rosland dan Engelsen, 2015; Yang *et al.*, 2014), dimana pada beberapa kasus kemoterapi menggunakan antrasiklin menyebabkan efek samping kardi toksisitas seperti kerusakan oksidatif, nekrosis pada kardiomyosit, apoptosis pada kardiomyosit, dan kerusakan yang diakibatkan pembentukan reactive oxygen species (ROS) (Li *et al.*, 2017).

Selain itu, treatment kanker secara konvensional juga menimbulkan efek samping yaitu agen kemoterapi bersifat immunosupresif terhadap sistem imun. Efek immunosupresif tersebut berupa infiltrasi makrofag pada solid tumour dan membentuk *tumour associated macrophage* (TAMs) (Bracci *et al.*, 2014) dan infiltrasi sel T regulatori (Treg) yang menekan aktivitas sel T pembunuh (CD8<sup>+</sup>T) via kontak antar sel atau dengan sekresi *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) (Issa-Nummer *et al.*, 2013).

Penelitian tentang senyawa yang berpotensi sebagai agen kemoterapi atau berpotensi sebagai antikanker konvensional

hanya melalui uji pre-klinikal yang dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan *cell line* dan *in vivo* menggunakan mencit, dan tidak melalui uji imunologi sebagai *follow-up*, sehingga menimbulkan masalah pada respon imunologi ketika diuji secara *in vivo* menggunakan *maximum tolerated dose* (MTD) yang terdapat pada uji klinikal tahap II dan tahap III (Galluzi *et al.*, 2015) sehingga perlu dilakukan suatu studi terhadap senyawa baru berpotensi sebagai antikanker terhadap sistem imun.

Berdasarkan studi yang telah dilakukan diketahui bahwa organisme laut merupakan sumber dari senyawa-senyawa alam yang bersifat bioaktif. Dikarenakan kondisi fisik dan kimia laut yang sedemikian rupa, diketahui bahwa setiap kelas dari organisme laut dapat menghasilkan senyawa bioaktif dengan berbagai variasi struktur molekul yang unik. Senyawa-senyawa ini berperan di dalam proses biokimia dan fisiologi organisme laut sebagai proteksi dari predator, infeksi, dan kompetisi (Hussain Md. *et al.*, 2011). Senyawa produk alami yang diperoleh dari organisme laut banyak ditemukan pada invertebrata laut (Imperatore *et al.*, 2014). Senyawa-senyawa bioaktif ini merupakan metabolit yang mempunyai manfaat secara farmakodinamik diantaranya berperan sebagai antifungal, antibiotik, toksik, sitotoksik, neurotoksik, antimitotik, antiviral, antineoplastik, dan aktivitas CV. Penelitian yang lebih baru mengungkapkan bahwa senyawa-senyawa ini berfungsi sebagai immunosupresan, anti-inflamasi, potensi obat Alzheimer dan lain-lain (Kelecom, 1999).

Senyawa berpotensi antikanker yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa trisindolina, yang merupakan senyawa derivat dari senyawa indola yang merupakan hasil asosiasi antara bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dengan spesies sponge *Hyrtios altus* (Kobayashi dan Ishibashi, 1994).

Senyawa indola merupakan senyawa derivatif yang terdiri dari *major group* senyawa aromatik heterosiklik yang digunakan secara luas bahan obat-obatan, bahan pewarna, dan solven. Senyawa indola banyak digunakan di dunia farmasi karena

bersifat toksik tinggi bagi mikroorganisme, mutagen dan karsinogen (Arora *et al.*, 2015).

## **1.2 Rumusan Permasalahan**

Senyawa Trisindolina 4 memiliki potensi sebagai senyawa antikanker dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 15,46  $\mu$ M, sehingga pada penelitian ini dilakukan uji lanjutan yaitu uji in-vitro senyawa trisindolina 4 terhadap induksi aktivitas fagositosis sel makrofag mencit (*Mus musculus*).

## **1.3 Batasan Masalah**

Batasan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Uji aktivitas fagositosis dari sel makrofag Mencit (*M. musculus*) dilakukan secara *in vitro*.
2. *Latex beads* digunakan sebagai representasi antigen yang menginduksi proses fagositosis pada sel makrofag.
3. Senyawa trisindolina-4 hasil sintesis didapatkan dari Departemen Kimia, Fakultas Ilmu Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

## **1.4 Tujuan**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas senyawa trisindolina-4 untuk meningkatkan kemampuan fagositosis sel makrofag Mencit (*M. musculus*).

## **1.5 Manfaat**

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai senyawa trisindolina-4 pengaruhnya terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag mencit (*M. musculus*).

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

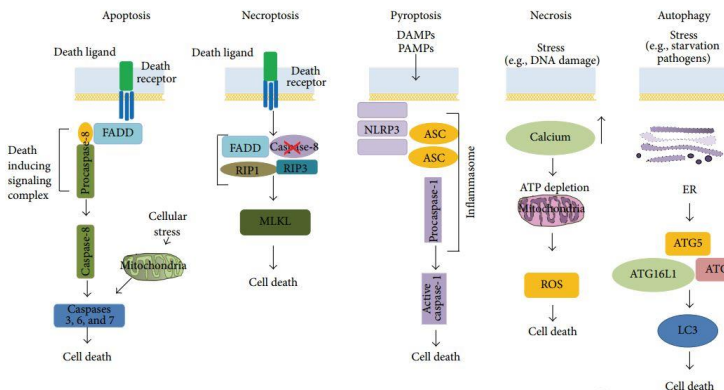
#### 2.1 Kanker

Kanker merupakan kondisi patologi yang disebabkan pembelahan sel terus-menerus secara tidak terkendali (Li *et al.*, 2011). Kanker berkembang dari sel-sel yang mengalami pembelahan terus-menerus kemudian terbentuk massa tumor primer yang kemudian dapat mengalami metastasis dan menyebar ke tempat lain di dalam tubuh melalui pembuluh darah. Beberapa tipe kanker penyebab kematian yang diakibatkan kanker adalah kanker paru-paru, kanker pada kolon, liver dan kanker payudara (Gibbs *et al.*, 1994).

Kanker payudara merupakan tumor malignan yang menyebabkan kematian pada 400.000 wanita di seluruh dunia (Kamanger *et al.*, 2006).

#### 2.2 Kematian sel

Kematian sel merupakan proses sel kematian sel berperan penting dalam proses ontogeni, homeostasis dan patologi. Beberapa tipe kematian sel yaitu apoptosis, nekrosis, nekroptosis, piroptosis dan autofagi (Negroni *et al.*, 2015).



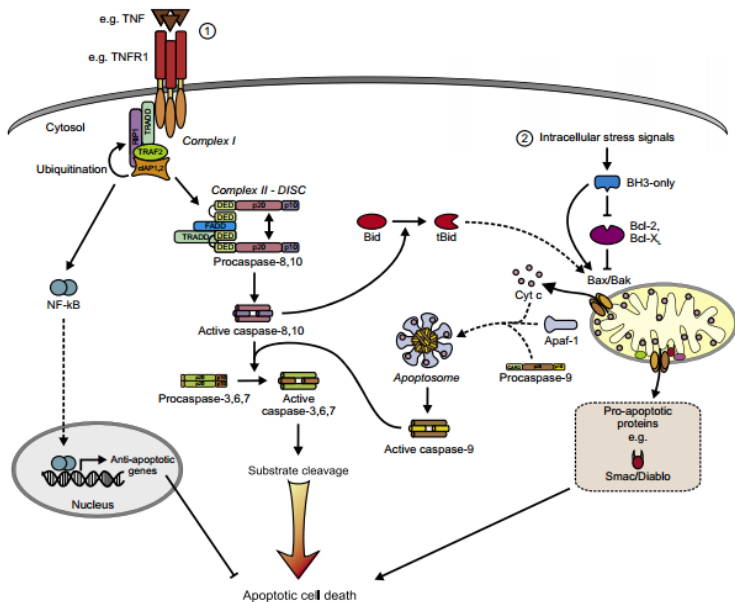
**Gambar 2.1.** Tipe kematian sel (Negroni *et al.*, 2015).

### 2.2.1 Apoptosis

Apoptosis merupakan kematian sel terprogram yang berperan penting di dalam homeostasis jaringan (Klener Jr. *et al.*, 2006). Namun pada kondisi tertentu, terutama banyak ditemukan dalam sel kanker, sel kehilangan kemampuan apoptosisnya dan menyebabkan perkembangan dan pertumbuhan sel yang tak terkendali (Muhammad *et al.*, 2015). Apoptosis ditandai dengan morfologi sel yang mengerut dan menebal, pyknosis atau kromatin mengalami kondensasi, dan organel-organel yang memampat. Pada proses selanjutnya yang disebut budding, sel mengalami *membrane blebbing* diikuti oleh karyoheksis dan fragmentasi sel menjadi badan apoptotik. Badan apoptotik terdiri dari sitoplasma dan organel-organel yang termampatkan tanpa fragmentasi nukleus. Pada proses ini integritas membran masih dipertahankan dengan membran plasma yang utuh. Kemudian, badan apoptotik akan ditelan secara subsekuen oleh makrofag, sel-sel parenkimal, atau sel neoplastik dan didegradasi oleh fagolisosom (Elmore, 2007).

Mekanisme apoptosis merupakan proses kaskade dengan beberapa pathway yang kompleks (Elmore, 2007). Beberapa pathway apoptosis yaitu, *caspase-dependent classical apoptosis* dan *caspase-independent* atau juga disebut sebagai nekroptosis. Pada mekanisme apoptosis *caspase-dependent*, apoptosis diinisiasi oleh faktor inisiasi intrinsik dan faktor inisiasi ekstrinsik. Pada faktor ekstrinsik, apoptosis diaktivasi oleh pengikatan reseptor transmembran atau *death receptor* oleh ligan-ligannya (Chaabane *et al.*, 2013). Dua pathway tambahan dari mekanisme apoptosis mengikutsertakan T-cell sitotoksik yang termediasi dan pembunuhan sel via *perforin-granzyme-dependent pathway*. Pada *perforin-granzyme-dependent pathway*, apoptosis dapat diinduksi via granzyme A atau granzyme B. Apoptosis yang diinduksi oleh faktor intrinsik, faktor ekstrinsik dan granzyme B merupakan apoptosis yang diinisiasi dengan pembelahan caspase-3 yang menghasilkan fragmentasi DNA, degradasi sitoskeletal dan nuklear protein, *crosslinking protein*, pembentukan badan

apoptotik, ekspresi dari ligan untuk sel reseptor fagositosis dan berakhir dengan proses fagositosis oleh sel-sel fagositik. Sedangkan pada granzyme A pathway, apoptosis diinduksi dengan caspase-independent pathway dengan kerusakan terhadap rantai tunggal DNA (Elmore, 2007).



**Gambar 2.2.** Mekanisme apoptosis (Duprez *et al.*, 2009).

a. Mekanisme apoptosis oleh faktor ekstrinsik

Mekanisme apoptosis yang diinduksi oleh faktor ekstrinsik adalah mekanisme apoptosis yang diinduksi oleh pengikatan *death ligand* pada *death ligand receptor* yang terdapat pada membran sel. *Death ligand* merupakan glikoprotein tipe II yang termasuk ke dalam superfamili tumour necrosis factor (TNF). Beberapa ligan yang termasuk ke dalam famili TNF adalah TNF- $\alpha$ , yang terdiri dari TNFSF2 dan catechin; ligan Fas yang terdiri dari TNFSF6, FasL, ligan CD95, dan Apo-1L; dan *TNF- $\alpha$ -related apoptosis-*

*inducing-ligand* yang terdiri dari TRAIL dan TNFSF10. Reseptor dari *death ligand* yang termasuk ke dalam famili TNF adalah protein membran tipe I yang termasuk ke dalam death receptor subgrup dari TNF receptor super-famili (TNF-R). Famili protein TNF-R dikarakterisasikan dengan adanya domain ekstraselular yang kaya sistein atau *cystein-rich domain extracellular* (CRDs) yang berperan dalam mengikat death ligand pada reseptornya (Klener *et al.*, 2006).

Mekanisme apoptosis oleh faktor ekstrinsik diawali dengan pengikatan tumor necrosis factor (TNF) kepada reseptornya yaitu *tumour necrosis factor receptor-1* (TNFR-1) diikuti oleh pembentukan dua kompleks TNFR. Kompleks I TNFR-1 terdiri dari adaptor protein *TNFR-associated death domain* (TRADD), *death domain* (DD) yang terdiri dari protein kinase receptor-interacting protein-1 (RIPK1), *ubiquitin E3 ligases TNFR-associated factor 2* (TRAF2), dan *cellular inhibitor of apoptosis protein* (cIAP1). Sedangkan kompleks II TNFR-1 terdiri dari adaptor *Fas-associated death domain protein* (FADD), caspase-8, RIPK1 (IIa), dan atau RIPK3 (IIb) (Belizario *et al.*, 2015). Pengikatan TNF pada reseptornya yang berupa TNFR-1 yang diikuti oleh pembentukan kompleks ligan-reseptor-protein adaptor akan memicu sinyal-sinyal downstream seperti NF- $\kappa$ B, JNK dan p38 untuk mempertahankan sel agar tetap hidup dengan menginduksi ekspresi dari gen antiapoptotik seperti cFLIP yang merupakan inhibitor dari proses signaling TNFR. Perubahan postranslasional dari kompleks I seperti deubiquitinasi RIP dapat menyebabkan diasosiasi RIP1 dan TRADD dari kompleks sehingga kompleks tersebut akan berikatan dengan FADD dan caspase-8 atau caspase-10 untuk membentuk kompleks apoptosis II (Koff *et al.*, 2015).

Pada mekanisme apoptosis oleh faktor ekstrinsik, pengikatan ligan dari TNF famili seperti CD95 (merupakan sinyal pertama apoptosis, yang terdiri dari Fas dan Apo1) dan TRAIL berikatan dengan satu *death receptor* utama untuk menarik molekul-molekul *death effector domain* (DD), FADD dan atau

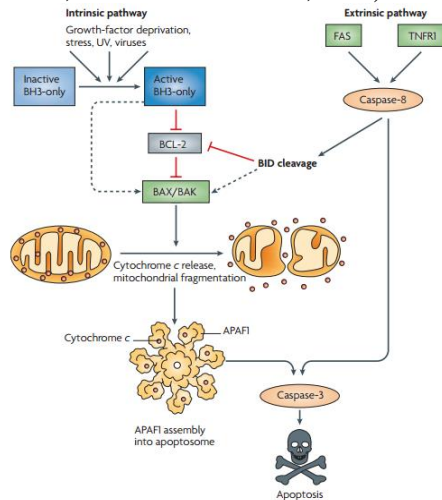
TRADD. Rekrutmen FADD memicu terjadinya pro-apoptotic pathway, sedangkan TRADD menginduksi sinyal antiapoptotik. FADD kemudian menarik protein-protein yang mengandung DD atau DED seperti caspase-8 atau caspase-10 untuk membentuk formasi death-inducing complex (DISC) pada kompartemen sitoplasmik. Karena TRADD berfungsi untuk menginduksi ekspresi dari gen antiapoptosis, tetapi pada kondisi tertentu, RIP1 akan diubiquitinasi oleh enzim cylindromatosis (CYLD) yang menyebabkan RIP1 dan TRADD terdissosiasi dari kompleks I. RIP1 dan TRADD kemudian berikatan dengan FADD membentuk kompleks II dan mengaktifkan caspase-8 dan caspase-10. Caspase-8 dan caspase-10 yang teraktivasi akan mengaktifkan caspase efektor seperti caspase-3, caspase-6 dan caspase-7 (Koff *et al.*, 2015).

a. Mekanisme apoptosis oleh faktor intrinsik

Apoptosis pada jalur intrinsik merupakan apoptosis yang diinisiasi tanpa mediasi dengan reseptor yang memberikan sinyal intraseluler pada sel target. Apoptosis pada jalur intrinsik diinisiasi oleh mitokondria (Elmore, 2007).

Mekanisme apoptosis oleh faktor intrinsik diinisiasi oleh stimulus internal seperti kerusakan DNA dan kurangnya growth factor dan pengaktifan protein BAX dan BAK. Protein BAX dan BAK kemudian bergerak ke mitokondria dimana kedua protein tersebut akan mengalami homodimerisasi untuk membentuk sisi berikatan dimer-dimer sehingga terbentuk pori-pori pada permukaan mitokondria dan meningkatkan permeabilitas membran (MOMP) yang menyebabkan protein dilepaskan dari ruang intermembran mitokondria. Salah satu protein membran yang dilepaskan tersebut adalah *cytochrome c*. *Cytochrome c* kemudian berikatan dengan molekul adaptor caspase, *apoptotic protease-activating factor* (Apaf-1), dengan kondisi terdapat ATP atau dATP, yang memicu oligomerisasi Apaf-1 menjadi molekul *wheel-like heptamer* yang mengaktifkan caspase dan rekrutmen domain (CARDs). Secara konsekuen, Apaf-1 CARD domain akan berikatan ke procaspase-9 CARDs untuk membentuk apoptosom.

Pada kompleks ini, procaspase-9 akan terdimerisasi dan bersifat auto-aktif membentuk caspase-9. Caspase-9 yang telah teraktivasi, akan mengaktifkan caspase efektor seperti caspase-3 dan caspase-7 (Koff *et al.*, 2015; Youle dan Strasser, 2008).



**Gambar 2.3.** Meaknisme intrinsik dan ekstrinsik pada apoptosis (Youle dan Strasser, 2008).

### 2.2.1.1 *Cystein aspartate specific protease (caspase)*

Caspase merupakan enzim yang disintesis dari proenzim yang diaktifkan oleh pembelahan proteolitik. Enzim yang aktif mempunyai struktur berupa kompleks heterotetramerik dari dua subunit yang terdiri dari sisi aktif dan dua subunit yang lebih kecil. Caspase terdiri dari beberapa macam caspase yang mempunyai fungsi sebagai promotor atau inhibitor apoptosis (Nicholson, 1999).

Caspase menjadi komponen penting dalam proses apoptosis dengan memotong sitoskeletal dan protein-protein yang penting untuk mempertahankan struktur sel dan enzim-enzim yang berperan dalam metabolisme dan sistem perbaikan sel (Gorman *et al.*, 1998).

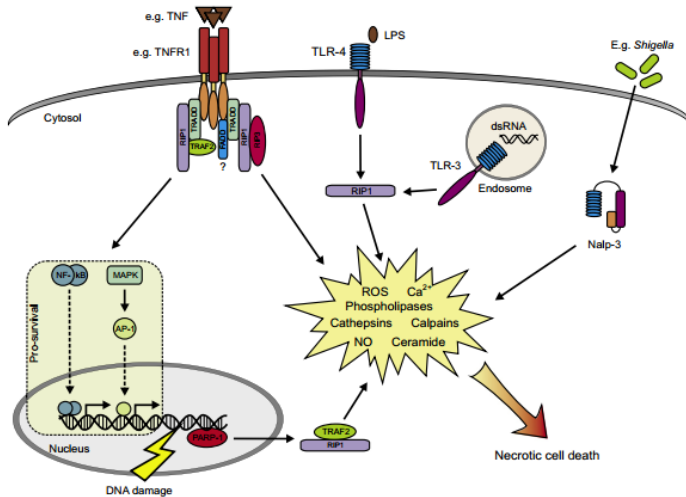
### 2.2.1.2 Bcl-2 Family Protein

Famili protein Bcl-2 dikarakterisasikan berdasarkan adanya homologous  $\alpha$ -helikal asam amino yang mengalami stretching. Berdasarkan fungsinya, famili Bcl-2 dibagi menjadi famili Bcl-2 anti-apoptotik yang terdiri dari Bcl-2 dan Bcl<sub>XL</sub>, dan Bcl famili pro-apoptotik yang terdiri dari BAX dan BAK. Famili protein Bcl-2 anti-apoptotik dicirikan dengan adanya domain Bcl-2 homologi (BH) domain 4, dan pada famili protein Bcl-2 pro-apoptotik dicirikan dengan adanya domain BH3 (Gross *et al.*, 1999; Vander Heiden dan Thompson, 1999).

### 2.2.2 Nekrosis

Nekrosis adalah kematian dari sel atau jaringan akibat respon terhadap stres fisikokimia ekstrem seperti panas, *osmotic shock*, dan *mechanical stress*. Oleh karena itu, nekrosis dideskripsikan sebagai kematian sel tidak terkontrol. Nekrosis terjadi ketika sel kehilangan integritas plasma membrannya diikuti oleh *cellular collapse* dan nukleus yang membesar. Karena kehilangan integritas dari membran plasmanya, nekrosis dapat menyebabkan respon berupa inflamasi (Krysko *et al.*, 2008; Vanden Berghe *et al.*, 2010).

Nekrosis dapat terjadi karena tidak adanya mekanisme apoptosis atau terdapat inhibisi terhadap apoptosis. Pada studi yang lebih lanjut yang telah dilakukan, diketahui bahwa agen induksi dari apoptosis juga dapat menyebabkan induksi terjadinya nekrosis (Vercammen *et al.*, 1998).



**Gambar 2.4.** Mekanisme nekrosis (Duprez *et al.*, 2009).

### 2.2.3 Nekroptosis

Nekroptosis adalah kematian sel akibat suatu *stressor* atau *injury* yang terprogram. Nekroptosis dikarakterisasikan dengan *cell swelling*, disfungsi mitokondria, permeabilisasi membran sel, dan keluarnya komponen-komponen sitoplasmik ke ekstraselular sel. Mekanisme nekroptosis berasosiasi dengan adanya *reactive oxygen species* (ROS) tetapi berbeda dengan apoptosis, nekroptosis tidak diikuti dengan fragmentasi DNA (Wu *et al.*, 2012). Beberapa faktor yang dapat menyebabkan sel mengalami nekroptosis adalah ligan dari *death receptor* family seperti  $\text{TNF}\alpha$ , faktor fisik dan kimia atau hipoksia (Fulda, 2013).

Mekanisme nekroptosis pada jalur  $\text{TNF}\alpha$ , diawali dengan pengikatan *death receptor* ligand  $\text{TNF}\alpha$  pada TNF receptor 1 (TNFR1) yang terdapat pada membran plasma. Proses ini diikuti oleh perekrutan molekul adaptor seperti TRADD yang terdiri dari *signaling molecules* seperti RIP1, cIAP1, cIAP2, TRAF2, dan TRAF5 pada sisi sitoplasmik dari TNFR1. Rekrutmen ini menyebabkan *signaling molecules* membentuk kompleks I, yang

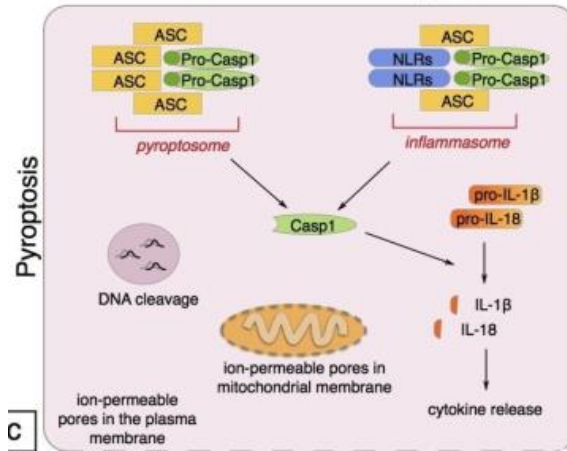


merupakan kompleks multimerik protein yang akan menyebabkan proses poliubiquitinilasi pada RIP1 oleh protein cIAP. Mengikuti proses poliubiquitinilasi, RIP1 akan menyediakan *docking site* bagi TAK1, TAB2, dan TAB3, yang akan menghasilkan pengaktifan pada faktor transkripsi dari NF- $\kappa$ B (Fulda, 2013).

Bersamaan dengan pengikatan TNF $\alpha$ , TNFR1 terinternalisasi untuk membentuk sinyal transduksi via membran-bound receptor yang terligasi yang secara subsekuen akan mengubah komposisi molekular dari signaling protein. Formasi ini menyebabkan formasi kompleks TNFR II yang mengandung FADD, RIP1, dan caspase-8 yang berfungsi untuk aktivasi caspase-8 yang berfungsi untuk inisiasi apoptosis terbentuk. Tetapi jika caspase-8 tidak dapat mengaktifkan kompleks ini, maka akan terbentuk kompleks lain yang disebut sebagai nekrosom. Kompleks nekrosom mengandung FADD, RIP1, dan penambahan RIP3 yang berfungsi untuk menginisiasi terjadinya nekroptosis (Fulda, 2013).

#### **2.2.4 Piroptosis**

Piroptosis merupakan kematian sel yang terjadi pada *host cell* yang diakibatkan oleh kondisi-kondisi yang menghalangi terjadinya kondisi apoptosis. Piroptosis dikontemplasikan sebagai kematian sel pro-inflamatori dikarenakan kebutuhannya pada aktivasi caspase-1 dan rute pro-inflamatori (Bergsbaken *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2003). Inflamatori sitokin yang dikeluarkan pada saat terjadinya piroptosis adalah IL-1 $\beta$  dan IL-18 (Fantuzzi dan Dinarello, 1999; Bergsbaken *et al.*, 2009).



**Gambar 2.5.** Piroptosis (Tricarico *et al.*, 2013).

### 2.2.5 Autofagi

Autofagi merupakan mekanisme pencernaan oleh lisosom dari sel eukariotik yang dikarakterisasikan dengan penghancuran organel yang telah rusak, protein-protein lama dan protein yang mengalami malformasi ketika proses biosintesis. Beberapa mekanisme induksi autofagi adalah regulasi autofagi oleh IGF-1/insulin, regulasi autofagi oleh m-TOR regulasi autofagi oleh DRAM dan p53 dan regulasi autofagi oleh FOXO dan ROS (Babadani, 2012).

### 2.3 Fagositosis

Fagositosis merupakan proses dimana sel akan menelan partikel-partikel solid ( $\geq 5\mu\text{m}$ ) untuk membentuk vesikel internal yang disebut fagosom (Flannagan *et al.*, 2012; Esteban *et al.*, 2015). Proses fagositosis berperan penting dalam respon imunitas tubuh terhadap patogen seperti bakteri, virus dan parasit (Liu *et al.*, 2014). Faktor penting yang mempengaruhi proses fagositosis adalah sifat virulensi dari agen patogen dan sistem pertahanan dari jaringan yang menjadi *host* dari patogen tersebut. Meskipun

jaringan-jaringan seperti sel-sel epitel, jaringan fibroblas dan sel-sel yang lain dapat menjalankan fungsi dari proses fagositosis, tetapi komponen utama dari proses fagositosis adalah neutrofil, monosit inflamator, makrofag, dan sel dendritik yang belum mengalami maturasi (Silva dan Correia-Neves, 2012).

Mekanisme fagositosis dimulai dengan pengenalan partikel oleh sel yang menyebabkan terjadinya proses fisikokimia antara membran sel dan partikel. Proses fisikokimia tersebut menyebabkan terikatnya partikel pada membran sel. Interaksi antara sel dan target dapat dikategorikan menjadi dua yaitu, interaksi antar membran sel target dan partikel secara langsung (non-sonic phagocytosis) dan interaksi antar membran sel target dan partikel secara tidak langsung (opsonic phagocytosis) yaitu interkalasi antar membran sel target dan partikel yang dihubungkan oleh opsonin seperti antibodi, komponen komplemen dan lain-lain (Hespanhol dan Mantovani, 2002).

Inisiasi fagositosis dimulai dengan pengikatan partikel pada permukaan membran plasma. Partikel kemudian masuk ke dalam sel dengan diselubungi oleh membran fagosomal yang merupakan derivat dari membran plasma (Aggeler dan Werb, 1982).

### **2.3.1 Sel – sel fagositik**

Sel-sel fagositik adalah sel dengan kemampuan untuk memfagositosis sel lainnya, dimana pada mamalia sel-sel fagositik terdiri atas polimorfonuklear leukosit, monosit dan makrofag (Hespanhol dan Mantovani, 2002).

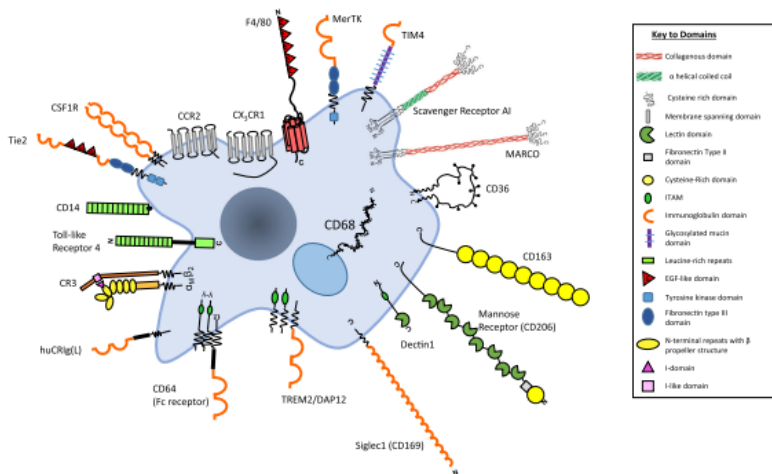
### **2.3.2 Makrofag**

Makrofag merupakan mononuklear fagosit dalam populasi heterogen yang terdapat pada jaringan tubuh yang dapat beradaptasi dengan lingkungan sekitarnya baik dalam keadaan stabil maupun dalam keadaan respon inflamasi (Hamilton, 2011).

Makrofag merupakan sel dengan banyak variasi bentuk sel dengan sebagian besar sel makrofag mempunyai ukuran diameter

14 – 20  $\mu\text{m}$ . Makrofag mempunyai perinuklear sitoplasma yang mengandung mitokondria, banyak lisosom, retikulum endoplasma kasar, apparatus golgi, yang mengindikasikan kemampuan untuk mensintesis dan mensekresikan protein. Sitoplasma perifer biasanya tidak memiliki organel dan bergerak terus-menerus (Tizard, 1988). Sel makrofag mempunyai morfologi berupa sel yang berbentuk besar dengan mengandung benang kromatin halus menyerupai benang sitoplasma dan mempunyai granula azurofilik (Yulinery dan Nurhidayat, 2012).

Makrofag pertama kali diidentifikasi oleh Élie Metchnikoff (1845-1916) pada akhir abad 19 dan dinyatakan sebagai sel fagosit besar. Berdasarkan aktivitas fagositosisnya, makrofag pertama kali diklasifikasikan sebagai sel-sel dari sistem retikuloendotelial dimana mencakup sel-sel lain seperti sel-sel endotelial, sel fibroblas, limfa dan sel retikular limfoid, sel Kuppfer, splenosit, dan monosit. Namun proses endositosis oleh sel endotelian yang berbeda dari proses fagositosis menghasilkan pendapat baru tentang klasifikasi makrofag pada akhir 1960 dimana sistem sel yang berperan dalam proses fagositosis dikelompokkan menjadi *mononuclear phagocytic system* (MPS). MPS merupakan kelompok sel yang dapat melakukan fagositosis dengan kemiripan secara morfologi dan fungsi. Sel yang termasuk ke dalam kelompok MPS adalah pro-monosit, monosit, makrofag, sel-sel dendritik (DCs), dan progenitor *bone marrow* (BM) (Gordon dan Plüdemann, 2017).



**Gambar 2.6** Makrofag dan reseptor pada plasma membrannya (Gordon dan Plüdemann, 2017).

Dalam reaksi inflamasi makrofag mempunyai kemampuan untuk mensekresikan beberapa faktor seperti chemokin, sitokin, growth factor, dan *reactive oxygen species* (ROS) (Chang *et al.*, 2012). Makrofag mempunyai kemampuan untuk menelan beberapa target seperti patogen, sel yang mati, partikel asing seperti debu dan pollen dan lain-lain (Paul *et al.*, 2013).

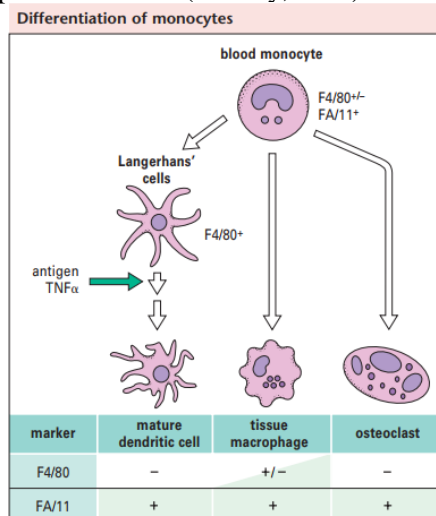
Berdasarkan responnya terhadap stimuli, makrofag dikategorikan menjadi makrofag M1 yaitu sel makrofag teraktivasi yang berfungsi sebagai pro-inflamator yang melawan infeksi dan makrofag M2 yaitu sel makrofag teraktivasi secara alternatif yang berasosiasi dengan respon kepada anti-inflamator dan perbaikan jaringan (Jablonski *et al.*, 2016) dimana makrofag M1 merupakan subset makrofag yang diaktifkan oleh ligan Toll-like receptor (seperti lipopolisakarida) dan interferon- $\gamma$ . Makrofag M1 mengekspresikan *cytokine* pro-inflamatori dan *nitric-oxide synthase* inducibel. Sedangkan makrofag M2 merupakan subset makrofag yang distimulasi oleh interleukin-4 (IL-4), atau IL-3. Makrofag M2 mengekspresikan arginase 1, yang merupakan

reseptor *mannose receptor CD206* dan *IL-4 receptor  $\alpha$ -chain* (Murray dan Wynn, 2011).

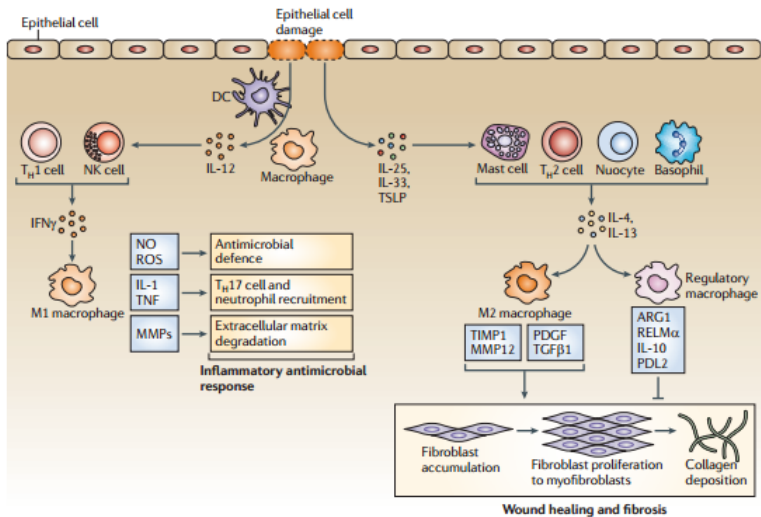
### 2.3.3 Perkembangan sel makrofag

Peristiwa inflamasi menyebabkan rekrutmen pada sel-sel imun untuk mengeliminasi material asing, penyembuhan terhadap jaringan yang rusak, dan untuk mempetahankan homeostasis jaringan. Monosit direkrut dari sistem peredaran darah, kemudian jumlah monosit dan neutrofil yang diproduksi dalam sum-sum tulang belakang akan meningkat. Monosit akan terdiferensiasi menjadi makrofag dan akan bercampur dengan sel-sel makrofag di jaringan tersebut dan akan memulai pembersihan terhadap material asing (Murray, 2016).

Perubahan sel monosit menjadi makrofag ini berkaitan dengan polarisasi sel monosit menjadi makrofag M1 atau M2 bergantung pada sinyal yang diterimanya untuk berpolarisasi sesuai dengan kebutuhan untuk perbaikan jaringan atau oleh faktor-faktor pro-inflamatori (Murray, 2016).



**Gambar 2.7** Perkembangan sel makrofag dari monosit (Brostoff et al., 2006).



**Gambar 2.8** Proses inflamasi dan rekrutmen makrofag (Murray, 2011).

### 2.3.4 Aktivasi makrofag

Studi tentang aktivasi makrofag secara konvensional dalam kondisi *in vitro* dilakukan dengan menstimulasi makrofag dengan memanfaatkan mikrobial agonis atau *cytokine* dan mengukur produksi *cytokine* efektor dan perubahan ekspresi genetik (Murray dan Wynn, 2011).

### 2.3.5 Fagositosis pada badan apoptotik

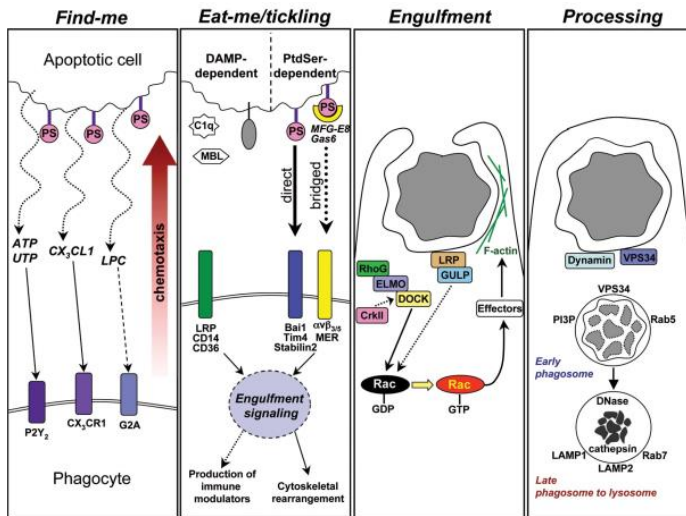
Proses fagositosis pada badan apoptotik oleh makrofag meliputi tiga proses utama yaitu pengenalan badan apoptotik oleh makrofag, pengikatan, dan engulphment debris badan apoptotik oleh makrofag (Fadok *et al.*, 2001; Arandjelovic dan Raichandran, 2015).

Fagositosis dapat dilakukan secara profesional yang merupakan fagositosis yang dilakukan oleh sel-sel fagositik seperti makrofag, osteoklas, eosinofil, neutrofil, monosit dan sel-sel dendritik (Ginhoux dan Guilliams, 2016), dan fagositosis secara non-profesional yang merupakan fagositosis yang dilakukan oleh

sel-sel fagosit terdekat seperti sel-sel epitelial, sel-sel endotelial, dan sel fibroblas. Keduanya diketahui mempunyai mekanisme fagositosis yang sama dengan profesional fagositosis menunjukkan kapasitas fagositosis lebih tinggi daripada kapasitas fagositosis non-profesional (Parnaik *et al.*, 2000).

Pada saat sel mengalami apoptosis, sel tersebut akan mengeluarkan sinyal *find-me* kepada sel-self fagosit. Sinyal *find-me* tersebut berupa *chemoattractan* solubel yang terdiri dari nukleotida trifosfat (ATP/UTP), lipopolifosfatidilkolin (lysoPC), dan chemokine CX<sub>3</sub>CL1 (Lauber *et al.*, 2003; Truman *et al.*, 2008; Elliot *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2010). Kontak yang terjadi diantara sel yang mengalami apoptosis dan makrofag kemudian dimediasi via ligan yang terdapat pada sel yang mengalami apoptosis (yang disebut sebagai sinyal *eat-me*) dan reseptor *engulfment* yang terdapat pada makrofag yang dapat mendeteksi marker *eat-me* tersebut. Marker sinyal *eat-me* tersebut merupakan fosfatidilserin (PtdSer) yang kemudian dapat direkognisi oleh reseptor PtdSer pada makrofag yang meliputi Bail, Tim-4, dan Stabilin-2 (Kobayashi *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007, 2008, 2009; Miyanishi *et al.*, 2007; Nakayama *et al.*, 2009).





**Gambar 2.9** Proses fagositosis badan apoptotik oleh makrofag (Elliot dan Ravichandran, 2010).

Pada saat apoptosis awal, membran sel akan kehilangan keasimetrisan membran dan keluarnya PtSer sebagai *apoptotic cell recognition*. Protein yang membantu dalam eksternalisasi PtSer telah teridentifikasi sebagai *eight transmembran spanning Transmembrane Protein 16F* (TMEM16F). PtSer yang telah tereksternalisasi dapat berikatan dengan *milk fat globule epidermal growth factor 8* (MFG-E8) yang kemudian dapat menjembatani fosfolipid menuju ke integrin  $\alpha_v\beta_3$  atau  $\alpha_v\beta_5$  yang terdapat pada makrofag dan monosit. PteSer juga dapat direkognisi secara langsung oleh reseptor-reseptor seperti *Bai1*, *Tim5*, dan *Stabilin2* (Segawa *et al.*, 2011; Dillon *et al.*, 2000; van den Eijnde *et al.*, 2001).

Beberapa faktor yang mempengaruhi proses fagositosis pada makrofag adalah ukuran partikel yang difagositosis, bentuk partikel, permukaan partikel dan formulasi penyusun partikel.

Ukuran partikel yang dapat difagositosis oleh sel makrofag adalah sekitar 3  $\mu m$  sampai dengan 6  $\mu m$ . Selain itu,

makrofag juga dapat memfagositosis partikel dengan ukuran nanopartikel (Hirota *et al.*, 2007). Ketika memfagositosis suatu partikel, makrofag akan mengalami perubahan struktural yaitu membran sel makrofag akan membentuk selubung pada partikel terfagositosis, mulai dari starting-point fagositosis yang bergantung pada sudut kontak yang dibentuk oleh bentuk partikel dan membran sel makrofag (Champion dan Mitragotri, 2006). Seperti kebanyakan sel mamalia lainnya, sel makrofag mempunyai muatan negatif pada permukaannya, sehingga permukaan partikel dengan muatan negatif yang lemah akan lebih cepat difagositosis daripada partikel-partikel dengan muatan negatif kuat seperti kelompok hidroksil dan atau kelompok sulfat (Makino *et al.*, 2003a). Sedangkan formulasi partikel dapat mempengaruhi proses fagositosis dikarenakan komposisi partikel akan berinteraksi langsung dengan komponen-komponen dalam sel makrofag pada saat proses fagositosis seperti contoh partikel dengan fosfatidilserin akan lebih mudah difagositosis daripada partikel dengan fosfatidiletanolamin atau asam fosfatidik (Makino *et al.*, 2003b).

### **2.3.5.1 *Mouse peritoneal macrophage***

Ruang peritoneal merupakan rongga yang tersusun atas membran yang berikatan dan terisi oleh cairan abdominal yang terdapat pada mamalia, dimana rongga peritoneal tersebut mencakup liver, limpa, organ-organ gastrointestinal dan viscera lain. Cairan dalam rongga peritoneal terdiri atas beberapa jenis sel imun seperti makrofag, sel B, dan sel T (Zhang *et al.*, 2008).

### **2.3.6 Indeks fagositosis**

Menurut Hartini *et al.* (2013), indeks fagositosis adalah jumlah lateks beads yang dicerna oleh makrofag pada 2 bidang pandang dikalikan dengan 100 kemudian dibagi dengan jumlah makrofag pada 2 bidang pandang.

### **2.3.7 Kapasitas fagositosis**

Kapasitas fagositosis merupakan jumlah suatu objek yang difagositosis oleh makrofag aktif (Hariyanti dkk., 2015).

### **2.3.8 *Latex beads***

*Latex beads* merupakan salah satu tipe polistirena mikrosfer yang mempunyai ukuran sekitar 0,5-4,6  $\mu\text{m}$  dan banyak digunakan dalam studi fagositosis oleh makrofag terutama makrofag peritoneal (Champion *et al.*, 2008).

## **2.4 Pengobatan kanker**

Beberapa mekanisme pengobatan kanker adalah terapi antihormonal, inhibisi pada tirosin kinase, targeting pada Bcl-Abr fusion protein, targeting pada reseptor epidermal growth factor (EGFR) dan targeting HER-2, (Rosland dan Engelsen, 2015).

Beberapa permasalahan dalam pengobatan kanker saat ini adalah solubilitas dari agen kemoterapi yang terbatas, reduksi bioavailability, adanya resistensi sel kanker terhadap agen kemoterapi, toksisitas sistemik dan biodistribusi nonselektif yang menyebabkan kerusakan pada sel-sel normal (Chakraborti *et al.*, 2017).

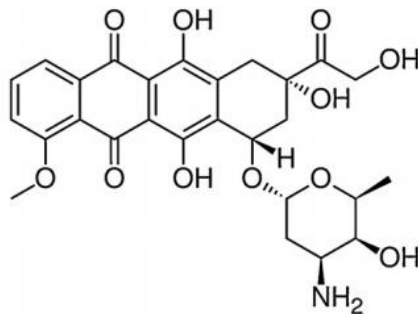
### **2.4.1 Doxorubicin**

Doxorubicin merupakan generasi pertama dari antibiotik *anthracycline* yang pada selular level dapat menginduksi inhibisi pada DNA-dependent DNA dan RNA polimerase sehingga menyebabkan supresi sintesis DNA dan RNA yang akan menyebabkan kerusakan pada sistem perbaikan DNA yang menyebabkan kematian sel (Czeczuga-Semeniuk *et al.*, 2004). Doxorubicin menginduksi kematian pada sel kanker dengan beberapa mekanisme, yaitu mekanisme interkalasi pada DNA dan disrupsi pada topoisomerase II  $\alpha$ , dan mekanisme pembentukan radikal bebas (Abuhammad dan Zihlif, 2013). Topoisomerase merupakan enzim yang berfungsi untuk meregulasi topologi DNA seperti replikasi DNA, transkripsi dan prose-proses nuklear

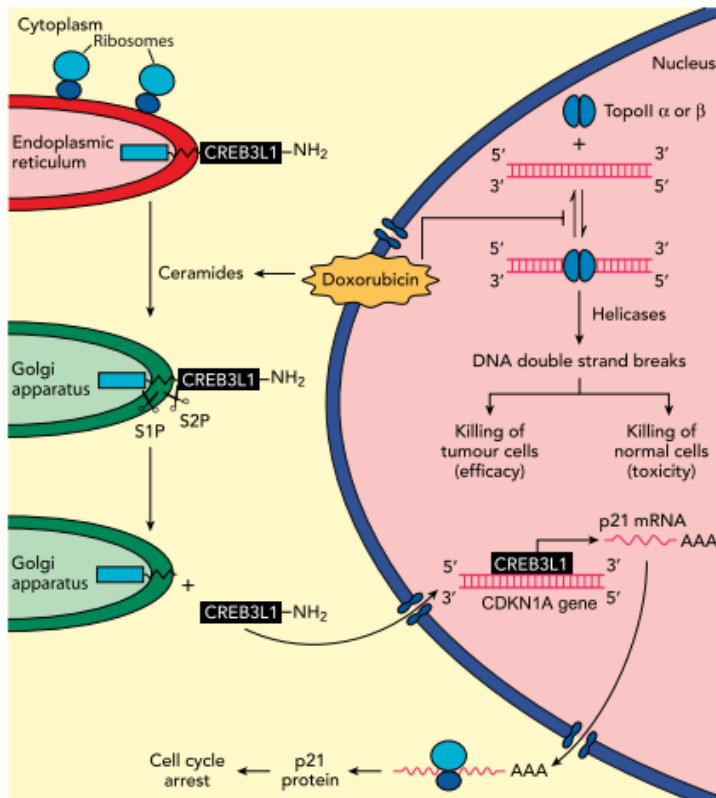
sehingga menyebabkan kerusakan pada sistem replikasi DNA, transkripsi dan proses nuklear lainnya pada sel (Yang *et al.*, 2014).

Pada mekanisme pembentukan radikal bebas, doxorubicin akan dioksidasi menjadi semiquinon, senyawa metabolit tidak stabil yang kemudian akan dikonversikan kembali menjadi doxorubicin dalam proses pelepasan *reactive oxygen species* (ROS). *Reactive oxygen species* dapat menyebabkan dampak buruk berupa peroksidasi lipid dan kerusakan membran, kerusakan DNA, *oxidative stress* dan dapat menyebabkan sel mengalami apoptosis (Thorn *et al.*, 2011).

Karena karakteristik doxorubicin yang dapat melepaskan radikal bebas, penggunaan doxorubicin sebagai agen anti kanker menyebabkan beberapa masalah kesehatan seperti disfungsi sistem sirkulasi seperti hipotensi dan hipertensi kompensatif dan vasokonstriksi akut pada dosis tertentu (Murata *et al.*, 2001).



**Gambar 2.10** Struktur kimia doxorubicin (Lei *et al.*, 2012).

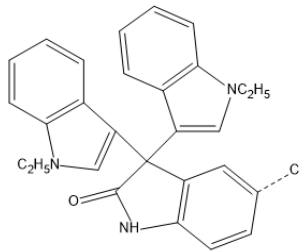


**Gambar 2.11** Mekanisme doxorubicin sebagai obat antikanker (Patel dan Kaufmann, 2012).

## 2.4.2 Senyawa trisindolina-4

Senyawa indol merupakan senyawa aromatik heterosiklik yang mempunyai konfigurasi heterobisiklik yaitu enam cincin yang bergabung dengan lima cincin pirol. Senyawa indol dapat disintesis dari berbagai macam tumbuhan dan bakteri (El Sayed *et al.*, 2015). Senyawa indol diketahui banyak berperan sebagai senyawa bioaktif anti-mikroorganisme (Salman *et al.*, 2015). Senyawa heterosiklik mengacu pada senyawa-senyawa siklik yang

mempunyai dua atau lebih elemen berbeda sebagai ‘ring member’ atom-atomnya (Bharwaj *et al.*, 2015).



5'-chloro-1,1''-diethyl-1H,1''H-[3,3':3',3''-terindol]-2'(1'H)-one

Chemical Formula:  $C_{28}H_{24}ClN_3O$

Exact Mass: 453.16

Molecular Weight: 453.96

**Gambar 2.12** Struktur kimia senyawa trisindolina-4 (Pertiwi, 2016).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Pertiwi (2017) menunjukkan aktivitas sitotoksik berbagai konsentrasi dari senyawa trisindolina secara *in vitro* pada sel kanker MCF-7 *cell line*. Didapatkan hasil bahwa nilai  $IC_{50}$  senyawa Trisindolina 1, 3, dan 4 terhadap MCF-7 *cell line* adalah sebagai berikut: 2,059  $\mu M$ , 3,9759  $\mu M$ , dan 15,46  $\mu M$ .

## **BAB III**

### **METODOLOGI**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian mengenai “Uji In-vitro Senyawa Antikanker Trisindolina-4 terhadap Sel Makrofag Mencit (*M. musculus*)” ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Gedung Radiopoetro Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan Laboratorium Zoologi dan Rekayasa Hewan, Departemen Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya pada Desember 2017-Mei 2018.

#### **3.2 Metode Penelitian**

##### **3.2.1 Aklimatisasi mencit (*M. musculus*)**

Prosedur aklimatisasi Mencit ini dimodifikasi dari Puspitasari (2016). *M. musculus* berusia kurang lebih 8 minggu dengan berat 20-30 gram sebanyak 6 ekor diaklimatisasi selama 1 minggu di tempat pemeliharaan mencit.

##### **3.2.2 Isolasi kultur makrofag**

Isolasi kultur makrofag dilakukan dengan cara prosedur narkose pada mencit (*M. musculus*) dengan menggunakan kloroform. Mencit diletakkan dengan posisi telentang untuk dilakukan pembedahan pada bagian perut kemudian dibersihkan selubung peritoniumnya dengan menggunakan alkohol 70%. Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) sebanyak 10 ml disuntikkan ke dalam rongga peritonium mencit, dan ditunggu dalam waktu 3 menit sambil digoyang-goyangkan.

Cairan peritoneal diambil dengan cara aspirasi dengan menggunakan jarum suntik. Cairan peritonium yang sudah didapatkan, disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian dibuang, dan diambil bagian peletnya. Pelet disuspensikan pada medium RPMI komplit yang telah ditambah dengan FBS 10%, amfoterisin B 0,5% dan penisilin/streptomisin 1%. Kemudian dilakukan penghitungan jumlah sel dengan *haemocytometer*, kemudian disuspensikan

dengan medium RPMI komplit sehingga didapatkan kepadatan sel  $2,5 \times 10^6$  sel/ml (Meurer *et al.*, 2016).

Coverslip dimasukkan ke dalam sumuran 24 plate-well, kemudian sebanyak 200  $\mu$ L suspensi sel diletakkan dalam sumuran dan diinkubasi selama 30 menit. Masing-masing sumuran ditambah RPMI komplit sebanyak 800  $\mu$ L. selanjutnya diinkubasi kembali selama 24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C.

### 3.2.3 Uji fagositosis pada *latex beads*

Uji kemampuan non-spesifik dilakukan secara in-vitro dengan menggunakan *latex beads*. Kemudian sumuran yang telah berisi kultur sel makrofag dicuci dengan RPMI sebanyak 2 kali, selanjutnya ditambahkan dengan larutan uji yang telah disuspensikan ke dalam medium RPMI komplit. Campuran tersebut kemudian didiamkan selama 4 jam. Suspensi ekstrak kemudian dibuang dan pada masing-masing sumuran ditambahkan suspensi latex sebanyak 200  $\mu$ L. Sumuran kemudian diinkubasi selama 60 menit. Setelah 60 menit diinkubasi, suspensi latex dibuang, sumuran kemudian dicuci dengan PBS dan difiksasi dengan metanol dan dikering anginkan pada suhu ruang. Kemudian dilakukan pewarnaan giemsa 10% kemudian dikeringkan. Kemudian dilakukan pengambilan pada *cover slip* yang terdapat pada sumuran. Fagositosis latex beads oleh makrofag kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali dengan cara dihitung jumlah latex beads yang telah difagositosis oleh makrofag dan makrofag yang aktif memfagositosis tiap 100 sel makrofag. Kemudian dilakukan pengujian indeks fagositosis dan kapasitas larutan uji dihitung dengan persamaan sebagai berikut,

$$\text{Kapasitas fagositosis} = \frac{\text{Jumlah makrofag yang aktif}}{\text{Jumlah makrofag yang dihitung}} \times 100\%$$



$$\text{Indeks fagositosis} = \frac{\text{Jumlah lateks yang terfagosit}}{\text{Jumlah makrofag aktif}}$$

Uji fagositosis sel makrofag dengan perlakuan perbedaan konsentrasi senyawa doxorubicin dilakukan dengan metode yang sama dengan metode yang dilakukan pada uji fagositosis dengan perlakuan senyawa trisindolina-4. Hasil uji aktivitas sel makrofag dengan perlakuan senyawa doxorubicin digunakan sebagai data pembandingan.

### **3.2.4 Orientasi konsentrasi uji**

Oleh karena aktivitas fagositosis makrofag tidak selalu memiliki hubungan yang linier dengan konsentrasi uji, maka perlu dilakukan orientasi untuk menentukan konsentrasi uji yang dapat memberikan aktivitas fagositosis. Orientasi dilakukan terhadap senyawa Trisindolina 4. Hasil yang didapatkan pada tahapan ini digunakan untuk menentukan konsentrasi uji.

### **3.2.5 Rancangan Penelitian dan Analisis Data**

Uji aktifitas fagositosis dengan mengukur indeks dan kapasitas fagositosis sel makrofag *M. musculus* merupakan penelitian yang menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL). Data yang diperoleh dari kapasitas fagositosis dan indeks fagositosis sel makrofag diuji menggunakan One Way ANOVA pada software SPSS versi 17.0 untuk mengetahui pengaruh pemberian senyawa trisindolina-4 dan senyawa doxorubicin terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag dengan taraf kepercayaan 95%.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

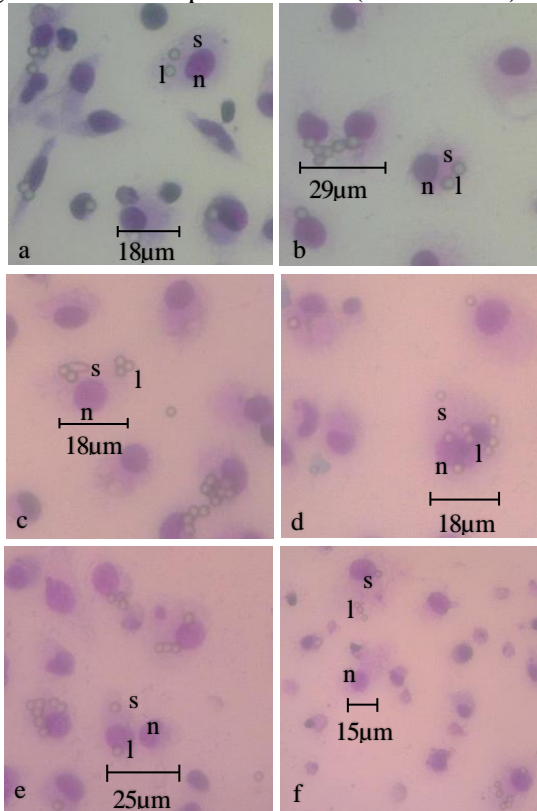
Uji *in-vitro* senyawa antikanker trisindolina-4 terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag *Mus musculus* dilakukan dengan pengamatan morfologi sel makrofag *M. musculus* maupun aktivitas fagositosis dengan mengukur kapasitas fagositosis dan indeks fagositosis sel makrofag *M. musculus*.

#### **4.1 Morfologi sel makrofag *M. musculus* perlakuan senyawa trisindolina-4**

Pengamatan morfologi sel makrofag dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400× pada 10 bidang pandang. Pengamatan morfologi sel makrofag yang dilakukan meliputi bentuk sel, komponen sel seperti sitoplasma, nukleus, warna sitoplasma, warna nukleus, dan *latex beads* yang terfagositosis. Pengamatan morfologi makrofag dengan pewarnaan giemsa menghasilkan warna biru keunguan pada nukelus dan sitoplasma berwarna biru hingga ke merah muda (Hoffbrand & Moss, 2016).

Pada perlakuan kontrol, beberapa sel makrofag menunjukkan karakteristik sel makrofag yang normal. Karakteristik sel makrofag normal menurut Sembulingan *et al.* (2012) dan Hoffbrand & Moss (2016) yaitu, nukleus dan area sitoplasma yang dapat dibedakan setelah dilakukan pewarnaan, sel menunjukkan aktifitas fagositosis terhadap polimer *latex beads*, dan sel bergerak secara amoeboid atau adanya perpanjangan dari sitoplasma perifer. Sel makrofag dengan perlakuan konsentrasi senyawa 6,25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, dan 50 mg/ml menunjukkan morfologi sel makrofag normal, dengan beberapa sel makrofag menunjukkan telah mengalami lisis maupun fragmentasi nukleus. Sel makrofag yang normal ditunjukkan dengan area nukelus dan sitoplasma yang teramati dan menunjukkan aktifitas fagositosis terhadap *latex beads* (Gambar 4.1c – 4.1e). Sedangkan sel makrofag pada perlakuan konsentrasi senyawa 100 mg/ml, morfologi yang teramati menunjukkan nukleus mengalami kerusakan dengan bentuk nukleus tak beraturan dan area sitoplasma perifer tidak teramati atau

beberapa sel yang teramati telah mengalami lisis sehingga tidak terjadi fagositosis terhadap *latex beads* (Gambar 4.1f).



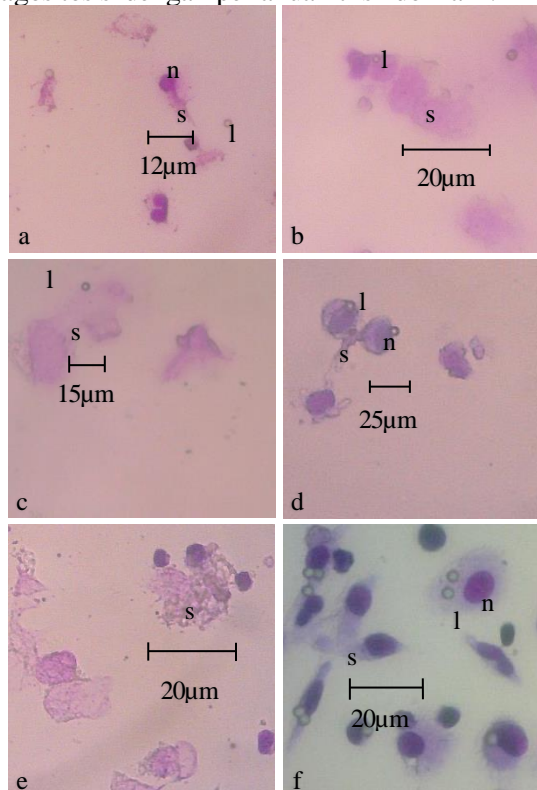
Gambar 4.1 Morfologi makrofag dengan perlakuan, (a) 0 mg/ml, (b) 6,25 mg/ml, (c) 12,5 mg/ml, (d) 25 mg/ml, (e) 50 mg/ml dan (f) 100 mg/ml. Ket. (n) nukleus, (s) sitoplasma, (l) *latex beads* (perbesaran 400×).

Berdasarkan pengamatan morfologi terhadap sel makrofag dengan perlakuan trisindolone-4, didapatkan hasil bahwa pada konsentrasi senyawa 6,75, 12,5, 25 dan 50 mg/ml sel-sel makrofag masih menunjukkan morfologi sel makrofag normal. Hal ini diduga disebabkan oleh nilai  $IC_{50}$  senyawa trisindolone-4 adalah 15,46  $\mu$ M yang digolongkan sebagai senyawa dengan nilai sitotoksitas sedang (Pertiwi, 2017). Nilai  $IC_{50}$  merupakan jumlah konsentrasi yang dibutuhkan oleh suatu senyawa untuk menghambat 50% aktivitas

populasi sel dalam kultur (Fortes *et al.*, 2016). Morfologi sel makrofag yang normal pada perlakuan 6,75, 12,5, 25 dan 50 mg/ml diduga disebabkan oleh aktivitas penghambatan terhadap sintesis selular oleh senyawa trisindolina-4 yang rendah, sedangkan sel-sel yang mengalami lisis pada perlakuan 100 mg/ml diduga disebabkan oleh *osmotic shock* akibat konsentrasi senyawa trisindolina-4 yang terlalu pekat (Krysko *et al.*, 2008).

#### 4.2 Morfologi sel makrofag *M. musculus* perlakuan senyawa doxorubicin

Uji aktivitas fagositosis sel makrofag dengan perlakuan doxorubicin digunakan sebagai data pembandingan terhadap hasil uji aktivitas fagositosis dengan perlakuan trisindolina-4.



Gambar 4.2 Morfologi makrofag dengan perlakuan perbedaan senyawa doxorubicin, (a) 6,25 mg/ml, (b) 12,5 mg/ml, (c) 25 mg/ml, (d) 50 mg/ml,

(e) 100 mg/ml dan (f) 0 mg/ml. Ket. (n) nukleus, (s) sitoplasma, (l) *latex beads* (perbesaran 400×).

Berdasarkan pengamatan morfologi terhadap sel makrofag dengan perlakuan senyawa doxorubicin, kematian sel makrofag yang teramati diduga diakibatkan oleh tiga mekanisme yaitu, kematian sel makrofag yang diakibatkan oleh *osmotic shock*, kematian sel makrofag yang diakibatkan oleh interkalasi DNA oleh senyawa doxorubicin dan kematian sel makrofag yang disebabkan oleh pembentukan radikal bebas oleh senyawa doxorubicin (Yang *et al.*, 2014).

Kematian sel yang diakibatkan oleh *osmotic shock* atau perbedaan konsentrasi cairan di dalam dan di luar sel, menyebabkan sel kehilangan integritas membran selnya diikuti oleh nukleus yang membesar dan termasuk kematian sel yang tidak terkontrol atau nekrosis dan dapat menimbulkan efek inflamasi (Krysko *et al.*, 2008; Vanden Berghe *et al.*, 2010). Sedangkan kematian sel yang disebabkan oleh interkalasi DNA dan radikal bebas oleh senyawa doxorubicin menyebabkan DNA dalam nukleus kehilangan kemampuan transkripsi, dan sistem replikasi sehingga mempengaruhi proses selular lain (Yang *et al.*, 2014). Kerusakan yang pada DNA kemudian akan menyebabkan sel mengalami apoptosis (Koff *et al.*, 2015).

### 4.3 Pengukuran dan uji aktivitas fagositosis makrofag

Aktivitas fagositosis dapat diukur dengan dua variabel yaitu indeks dan kapasitas fagositosis. Indeks fagositosis didefinisikan sebagai jumlah partikel (*latex beads*) yang dapat difagosit oleh makrofag pada 2 bidang pandang dikalikan dengan 100 kemudian dibagi dengan jumlah makrofag pada 2 bidang pandang tersebut (Hartini dkk., 2013). Sedangkan kapasitas fagositosis didefinisikan sebagai jumlah maksimum suatu objek atau partikel yang dapat difagosit oleh makrofag aktif (Fang *et al.*, 2006; Hariyanti dkk., 2015). Penghitungan jumlah sel makrofag aktif dan nonaktif dilakukan dengan pengamatan mikroskop pada preparat sel makrofag dengan perbesaran 400× dan jumlah bidang pandang sebanyak 10 bidang pandang pada setiap konsentrasi uji,

kemudian dilakukan uji ANOVA *one way* untuk mengetahui pengaruh dari konsentrasi senyawa terhadap aktivitas sel makrofag.

Hasil analisis hasil pengukuran indeks fagositosis dan kapasitas fagositosis sel makrofag *M. musculus* dengan ANOVA pada aplikasi SPSS versi 17.0 ditunjukkan dalam Tabel 4.1 (kapasitas fagositosis) dan Tabel 4.2 (indeks fagositosis). Hasil analisis tersebut digunakan sebagai acuan dalam menentukan konsentrasi terbaik dari senyawa trisindolina-4 dalam mempengaruhi aktivitas fagositosis sel makrofag *M. musculus*.

#### 4.3.1 Kapasitas fagositosis

Hasil penghitungan kapasitas fagositosis makrofag ditunjukkan pada tabel 4.1 berikut.

**Tabel 4.1** Nilai kapasitas fagositosis sel makrofag *M. musculus* dengan perlakuan perbedaan konsentrasi senyawa trisindolina-4 dan doxorubicin.

Konsentrasi (mg/ml)	Kapasitas fagositosis perlakuan trisindolina	Kapasitas fagositosis perlakuan doxorubicin
Kontrol	21,33 ± 5,24 <sup>a,b</sup>	<b>21,33 ± 5,24<sup>b</sup></b>
6,75	23,44 ± 7,16 <sup>a,b</sup>	9,110 ± 2,97 <sup>a,b</sup>
12,5	21,89 ± 1,68 <sup>a,b</sup>	15,64 ± 7,88 <sup>b</sup>
25	17,33 ± 2,90 <sup>a</sup>	17,7 ± 3,44 <sup>b</sup>
50	<b>32,89 ± 1,49<sup>b</sup></b>	3,52 ± 0,9 <sup>a</sup>
100	23,33 ± 6,35 <sup>a,b</sup>	0,93 ± 0,93 <sup>a</sup>

*Ket.* Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan signifikan ( $P < 0,05$ ).

Uji ANOVA nilai kapasitas fagositosis dengan perlakuan senyawa trisindolina-4 dan perlakuan doxorubicin menunjukkan hasil yang signifikan, kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey. Berdasarkan hasil uji Tukey, konsentrasi senyawa trisindolina-4 optimal yang diperlukan untuk meningkatkan nilai kapasitas fagositosis adalah 50 mg/ml. Sedangkan pada perlakuan doxorubicin, nilai kapasitas fagositosis meningkat pada konsentrasi doxorubicin 6,75, 12,5, dan 25 mg/ml, kemudian menurun pada konsentrasi 50 dan 100 mg/ml.

### 4.3.2 Indeks fagositosis

Hasil perhitungan indeks fagositosis dengan perlakuan perbedaan senyawa trisindolina-4 ditunjukkan oleh Tabel 4.2.

**Tabel 4.2** Nilai indeks fagositosis sel makrofag *M. musculus* dengan perlakuan perbedaan konsentrasi senyawa trisindolina-4 dan doxorubicin.

Konsentrasi	Indeks fagositosis perlakuan trisindolina-4	Indeks fagositosis perlakuan doxorubicin
Kontrol	1,80 ± 0,30 <sup>a</sup>	<b>1,80 ± 0,300<sup>b</sup></b>
6,75 mg/ml	1,95 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,395 <sup>a</sup>
12,5 mg/ml	1,99 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,635 <sup>a,b</sup>
25 mg/ml	<b>2,21 ± 0,39<sup>a</sup></b>	0,37 ± 0,105 <sup>a</sup>
50 mg/ml	1,92 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,006 <sup>a</sup>
100 mg/ml	1,82 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,006 <sup>a</sup>

*Ket.* Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan signifikan ( $P < 0,05$ ).

Uji ANOVA nilai indeks fagositosis dengan perlakuan senyawa trisindolina-4 menunjukkan nilai yang tidak signifikan, sedangkan nilai indeks fagositosis perlakuan doxorubicin menunjukkan nilai yang signifikan. Kemudian dilakukan uji Tukey pada hasil indeks fagositosis perlakuan doxorubicin. Berdasarkan hasil uji Tukey diketahui bahwa nilai indeks fagositosis tertinggi terdapat pada perlakuan konsentrasi senyawa trisindolina-4 25 mg/ml. Sedangkan nilai indeks fagositosis pada perlakuan doxorubicin tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol.

Berdasarkan hasil uji Tukey, nilai kapasitas fagositosis dan indeks fagositosis yang digunakan untuk menentukan efisiensi aktivitas fagositosis oleh senyawa trisindolina-4, tidak menghasilkan nilai aktivitas fagositosis optimum pada konsentrasi perlakuan yang sama sehingga dilakukan uji rasio. Uji rasio dilakukan dengan membandingkan rata-rata nilai indeks fagositosis dengan rata-rata nilai kapasitas fagositosis yang didapatkan. Uji rasio telah dilakukan sebelumnya oleh Sun *et al.* (2008), dengan membandingkan nilai indeks fagositosis dan kapasitas fagositosis monosit ayam Starbro dan Sticky.

Hasil penghitungan rasio indeks dan kapasitas fagositosis ditunjukkan pada Tabel 4.3.

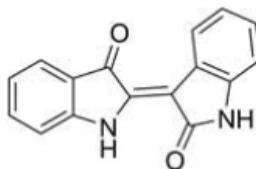


**Tabel 4.3** Rasio antara indeks dan kapasitas fagositosis makrofag.

Konsentrasi (mg/ml)	Kapasitas		Indeks		Rasio	
	Tris-4	Doxo	Tris-4	Doxo	Tris-4	Doxo
0	21,33	21,33	1,8	1,8	0,084	<b>0,084</b>
6,75	23,44	9,11	1,95	0,41	0,083	0,045
12,5	21,89	15,64	1,99	0,91	0,091	0,058
25	17,33	17,7	2,21	0,37	<b>0,128</b>	0,021
50	32,89	3,52	1,92	0,06	0,058	0,017
100	23,33	0,93	1,82	0,02	0,078	0,022

Berdasarkan hasil perhitungan rasio, konsentrasi senyawa optimum dengan nilai aktivitas fagositosis tertinggi terdapat pada perlakuan konsentrasi senyawa trisindolina-4, 25 mg/ml sedangkan pada perlakuan doxorubicin, hasil aktifitas fagositosis tertinggi terdapat pada konsentrasi 0 mg/ml.

Senyawa trisindolina-4 merupakan salah satu senyawa turunan dari senyawa trisindolina. Senyawa trisindolina mempunyai jalur oksidoreduktase dalam tubuh, yang menyebabkan hidrolisis pada atom C ketiga. Hidrolisis ini akan menghasilkan 2 molekul indol dan 1 molekul isatin. Kondensasi yang terjadi pada indol dan isatin akan menyebabkan terbentuknya molekul indirubin (Yoo *et al.*, 2008) sehingga untuk masuk ke dalam sel, senyawa indirubin, yang berperan sebagai ligan, harus berikatan dengan salah satu reseptor yang terdapat dalam sel makrofag.

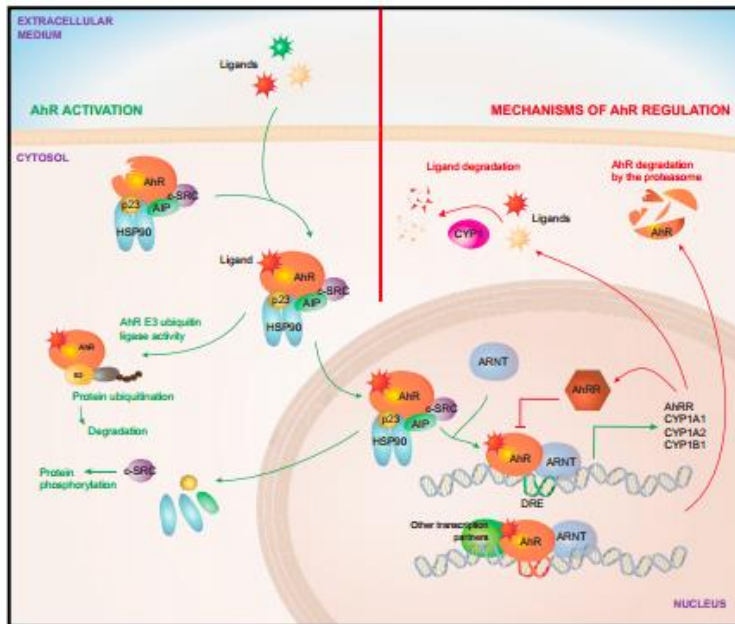


Indirubin

Gambar 4.4 Struktur molekul indirubin (Stejskalova *et al.*, 2011).

*Aryl hydrocarbon receptor* (AhR) merupakan reseptor yang dihipotesiskan berperan dalam proses immunomodulasi oleh senyawa trisindolina-4. Hal ini didukung dengan sifat ligan-ligan dari reseptor AhR yang mempunyai karakteristik merupakan molekul hidrofobik, mempunyai struktur kimia berbentuk planar,

dengan molekul indirubin yang merupakan molekul produk dari kondensasi indol dan isatin, merupakan ligan endogenous dari AhR (Stejskalova *et al.*, 2011).



Gambar 4.5 Mekanisme signaling AhR (Gutiérrez-Vásquez & Quintana, 2018).

AhR merupakan reseptor yang dapat aktif karena pengaruh ligan eksogenous maupun endogenous. AhR merupakan anggota dari faktor transkripsi Pernt-Arnt-Sam (PAS) superfamili yang berperan dalam merespon sinyal-sinyal dari lingkungan seperti perubahan ritme circadian (BMAL1 dan BMAL2), tekanan oksigen atau potensial redoks (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ) (Kewley *et al.*, 2004). Dalam keadaan inaktif, AhR berada di sitoplasma dan berikatan dengan heat-shock protein 90 (HSP90) dan beberapa protein lain. Ligan hidrofobik yang terpenetrasi ke dalam sel, akan berikatan dengan AhR yang akan menyebabkan translokasi AhR menuju nukleus. Dalam nukleus, AhR akan membentuk struktur heterodimer dengan AhR nuclear translocator (ARNT). Kompleks

AhR/ARNT akan berikatan dengan sekuens DNA spesifik yang disebut dioxine responsive element (DRE) atau xenobiotic responsive element (XRE) pada promotor dari gen target dan akan memicu ekspresi dari gen target tersebut. Proses signaling AhR merupakan *negative feedback* dimana setelah proses signaling selesai, AhR akan keluar dari nukleus menuju sitosol didegradasi oleh sistem proteosom-ubiquitin (Stejskalova *et al.*, 2011).

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa, sel makrofag *Mus musculus* dengan perlakuan senyawa trisindolina-4 mempunyai nilai aktifitas fagositosis tertinggi pada konsentrasi 25 mg/ml. Sedangkan pada sel makrofag dengan perlakuan doxorubicin mempunyai nilai aktifitas fagositosis tertinggi pada perlakuan kontrol.

#### **5.2 Saran**

Saran yang diberikan penulis untuk penelitian selanjutnya,

1. Penelitian aktivitas fagositosis sel makrofag dilakukan sampai dengan tingkat selular.
2. Penelitian tentang aktivitas fagositosis dilakukan secara *in-vivo*.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## DAFTAR PUSTAKA

Abuhammad, S., Zihlif, M. 2013. Gene Expression Alterations in Doxorubicin Resistant MCF-7 Breast Cancer Cell Line. **Journal of Genomics** Vol. 101.

Aggeler, J., Werb, Z. 1982. Initial Events during Phagocytosis by Macrophage Viewed from Outside and Inside the Cell: Membrane-Particle Interactions and Clathrin. **The Journal of Cell Biology** Vol. 94.

Akkoc, M. K., Yuksel, M. Y., Durmaz, I., Atalay, R. C. 2012. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Indole-based 1,4-disubstituted piperazines as Cytotoxic Agents. **Turkey Journal of Chemistry** Vol. 36.

American Type Culture Collection. Formulation of RPMI-1640 Medium. [www.atcc.org](http://www.atcc.org) diakses pada tanggal 9 November 2017.

Arandjelovic, S., Ravichandran, S. 2015. Phagocytosis of Apoptotic Cells in Homeostasis. **Nature Journal of Immunology** Vol. 16 No. 9 pp. 907-917.

Arora, P. K., Sharma, A., Bae, H. 2015. Microbial Degradation of Indole and Its Derivatives. **Hindawi Publishing Corporation Journal of Chemistry** Vol. 2015.

Arreduoani, M. S. 2014. Is The Scavenger Receptor MARCO A New Immune Checkpoint? **Journal of Oncoimmunology** Vol. 3 No. 10.

Babadani, M. 2012. Autophagy Mechanism, Functions, Regulations and Disorders. **International Scholarly Research Network Cell Biology** Volume 2012.

Badia, E., Morena, M., Lauret, C., Boulahtour, A., Boule, N., Cavailles, V., Balaguer, P., Cristol, J. P. 2016. Effect of Tamoxifen and Fulvestrant Long-term Treatments on ROS Production and (Pro/Anti)-Oxidant Enzymes mRNA Levels in MCF-7-derived Breast Cancer Cell Line. **Springer Journal of Breast Cancer** 23: 692-700.

Belizario, J., Vieira-Cordeiro, L., Enns, S. 2015. Necroptotic Cell Death Signaling and Execution Pathway: Lessons from Knockout Mice. **Journal of Mediations of Inflammation** Volume 2015.

Bergsbaken, T., Fink, S. L., Cookson, B. T. 2009. Pyroptosis: Host Cell Death and Inflammation. **Nat. Rev. Microbiol.** Vol. 7 pp. 99-109.

Bharwaj, V., Gumber, D., Abbot, V., Dhiman, S., Sharma, P. 2015. Pyrrole: A Resourceful Small Molecule in Key Medicinal Hetero-aromatics. **The Royal Society of Chemistry Journal** Vol. 3.

Boopathy, N. S., Kathiresan, K. 2010. Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview. **Journal of Oncology** Vol. 2010.

Bracci, L., Schiavoni, G., Sistigu, A., Belardelli, F. 2014. Immune-based Mechanism of Cytotoxic Chemotherapy: Implications for the Design of Rationale-based Combined Treatment Against Cancer. **Cell Death Differ.** Vol. 21 pp. 25-25.

Brostoff, J., Roth, D. B., Roitt, I. 2006. **Immunology** Seventh Edition. Canada: Elsevier Ltd. ISBN: 978-0-8089-2332-9.

Chakraborti, S., Chaakraborti, S., Saha, S., Manna, A., Banerjee, S., Adhikary, A., Sarwar, S., Hazra, T. P., Das, T., Chakrabarti, P. 2017. PEG-functionalized Zinc Oxide Nanoparticles Induce Apoptosis in Breast Cancer Cells Through Reactive Oxygen



Species-dependent impairment of DNA Damage Repair Enzyme NEIL2. **Journal of Free Radical Biology and Medicine** 103.

Champion, J. A., Walker, A., Mitragotri, S. 2008. Role of Particles Size in Phagocytosis of Polimeric Microspheres. **Pharm. Res. Jour.** Vol. 25 No. 8 pp. 1815-1821.

Champion, J.A., and Mitragotri, S. 2006. Role of target geometry in phagocytosis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103 pp. 4930-4934.

Chang, M. Y., Chan, C. K., Braun, K. R., Green, P. S., O'Brien, K. D., Chait, A., Day, A. J., Wight, T. N. 2012. Monocyte-to-macrophage Differentiation Synthesis and Secretion of Complex Intracellular Matrix. **The Journal of Biological Chemistry** Vol. 287. No. 17 pp. 14122-14135.

Czeczuga-Semeniuk, E., Wolczynki, S., Dabrowska, M., Dzieciol, J., Anchim, T. 2004. The Effect of Doxorubicin and Retinoids on Proliferation, Necrosis and Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Journal Folia Histochemica et Cytobiologica** Vol. 4 No. 24 page 221-227.

Dillon, S. R., Mancini, M., Rosen, A., Schlissel, M. S. 2000. Annexin V Binds ti Viable b Cells and Colocalize with a Marker of Lipid Rafts upon B Cell Receptor Activation. **Journal of Immunology** Vol. 14 pp. 1322-1332.

Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P. 2009. Major Cell Death Pathways at Glance. **Journal of Microbes and Infection** Vol. 11 pp. 1050- 1062.

El Sayed, M. T., Hamdy, N. A., Osman, D. A., Ahmed, K. M. 2015. Indoles as Anticancer Agents. **Journal Advances in Modern Oncology Research** 1(1).

Elliot, M. R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., Park, D., Woodson, R. I., Ostankovich, M., Sharma, P. 2009. Nucleotides Released by Apoptotic Cells Act as a Find-me Signal to Promote Phagocytic Clearance. **Nature Journal** Vol. 461 pp. 282-286.

Elliot, M. R., Ravichandran, K. S. 2010. Clearance of Apoptotic Cells: Implications in Health and Disease. **Journal of Cell Biology: Review** Vol. 189 No. 7 pp. 1059-1070.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Journal of Toxicology and Pathology** 35(4): 495-516.

Esteban, M. A., Cuesta, A., Chaves-Pozo, E., Meseguer, J. 2015. Phagocytosis in Teleosts, Implication of The New Cell Involved. **Journal of Biology** Vol. 4 page 907-922.

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Henson, P. M. 2001. Phagocytosome Receptors for Apoptotic Cells: Recognition, Uptake, and Consequences. **The Journal of Clinical Investigation** Vol. 8 No. 7 pp. 957-962.

Fang, H. W., Yang, C. B., Chang, C. H., Huang, C. H., Liu, H. L., Fang, S. B. 2006. The Potential Role of Phagocytic Capacity in the Osteolytic Process Induced by Polyethylene Wear Plastic. **The Journal of International Medical Research** Vol. 34 pp. 655-664.

Fantuzzi, G., Dinarello, C. A. 1999. Interleukin-18 and Interleukin-1 beta: Two Cytokine Substrates for ICE (caspase-1). **Journal of Clinical Immunology** Vol. 19 pp. 1-11.

Flannagan, R. S., Jaumouille, V., Grinstein, S. 2012. The Cell Biology of Phagocytosis. **Annual Review of Pathology** Vol. 7 pp. 61-98.

Fulda, S. 2013. Alternative Cell Death Pathways and Cell Metabolism. **International Journal of Cell Biology** Vol. 2013.

Galluzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. 2015. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. **Cancer Cell Journal** Vol. 28 pp. 690-714.

Gibbs, J. F., Oliff, A. 1994. Pharmaceutical Research in Molecular Oncology. **Journal of Cell** 79 pp. 6371-6378.

Ginhoux, F., Williams, M. 2016. Tissue-resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. **Journal of Immunity** Vol. 44 pp. 439-449.

Gordon, S., Plüddeman, A. 2017. Tissue Macrophage: Heterogeneity and Function. **BioMed Central Journal** Vol. 15 No. 53 pp. 1-18.

Gorman, A. M., Orrenius, S., Ceccatelli, S. 1998. Apoptosis in Neuronal Cells: Role of Caspases. **Neuroreport Journal** Vol. 9 pp. 49-55.

Gross, A., Mc Donnell, J. M., Korsmeyer, S. J. 1999. BCL-2 Family Members and The Mitochondria in Apoptosis. **Genes Dev.** 13 pp.1899-1911.

Gutierrez-Vazquez, C., Quintana, F. J. 2018. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. **Journal of Immunity** Vol. 48 pp. 19-33.

Hartini, Y. S., Wahyuono, S., Widyarini, S., Yuswanto, A. 2013. Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Fraksi-fraksi dari Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocoatum* Ruiz & Pav.) secara In-vitro. **Jurnal Ilmu Kefarmasian** Vol. 11 No. 2 pp. 108-115.

Hariyanti, Sunaryo, H., Nurlaily, S. 2015. Efek Immunomodulator Fraksi Etanol dari Ekstrak Etanol 70% Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Berdasarkan Peningkatan Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag Peritoneum Mencit secara In-vitro. **Jurnal Pharmacy** Vol. 12 No.1 pp. 58-69.

Hasegawa, T., Hirota, K., Tomoda, K., Ito, F., Inagawa, H., Kochi, C., Soma, G., Makino, K., and Terada, H. 2007. Phagocytic Activity of Alveolar Macrophages toward Polystyrene Latex Microspheres and PLGA Microspheres Loaded with Anti-tuberculosis Agent. **Colloid Surf B: Biointerfaces** Vol. 60 pp. 221-228.

Hespanhol, M. R., Mantovani, B. 2002. Phagocytosis by Macrophages Mediated by Receptors for Denatured Proteins Dependence on Tyrosine Protein Kinase. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 35:383-389.

Hoffbrand, A. V., Moss, P. A. H. 2016. **Hoffbrand's Essentials Haematology 7th Edition**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd. ISBN: 978-118-40867-4.

Hussain Md., S., Fareed, S., Ansari, S., Sajid khan, M. 2012. Marine Natural Products: A Lead for Anticancer. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences** Vol. 41(1) pp. 27-39.

Imperatore, C., Aiello, A., D'Aniello, F., Senese, M., Menna, M. 2014. Alkaloids from Marine Invertebrates as Important Leads for Anticancer Drugs Discovery and Development. **Journal of Molecules** Vol. 19.

Inaba, K., Inaba, M., Deguchi, M., Hagi, K., Yasumizu, R., Ikehara, S., Muramatsu, S., Steinman., R. M. 1993. Granulocytes, Macrophages, and Dendritic Cells Arise from A Common Major

Histocompatibility Complex Class II-negative Progenitor in Mouse Bone Marrow. **Proc. Natl. Acad. Science USA: Immunology** Vol. 90 pp. 3038-3042.

Issa-Nummer, Y., Darb-Esfahani, S., Loibl, S., Kunz, G., Nekljudova, V., Schrader, I., Sinn, B. V., Ulmer, H., Kronenwett, R., Just, M., Kühn, T., Diebold, K., Untch, M., Holms, F., Blohmer, J., Habeck, J., Dietel, M., Overkamp, F., Krabisch, P., von Minckwitz, G., Denkert, C. 2013. Prospective Validation of Immunological Infiltrate for Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in HER2-Negative breast Cancer – A Substudy of the Neoadjuvant Geparquinto Trial. **Plos One Journal** Issue 12 pp. 1-7.

Jablonski, K. A., Gaudet, A. D., Amici, S. A., Popovich, P. G., Guerau-de-Arellano, M. 2016. Control of Inflammatory Macrophage Transcriptional Signature by miR-155. **Research Article on PLOS Journal**.

Jing, J., Yang, I. V., Hui, L., Patel, J. A., Evans, C. M., Prikeris, R., Kobzik, L., O'Connor, B. P., Schwatz, D. A. 2013. Role of MARCO in Innate Immune Tolerance. **Journal of Immunology** Vol. 190 No. 12 pp. 6360-6367.

Kakde, D., Jain, D., Shrivasta, V., Kakde, R., Patil, A. T. 2011. Cancer Therapeutic Opportunities, Challenges and Advantages in Drug Delivery. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**.

Kamangar, F., Dores, G. M., Anderson, W. F. 2006. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. **Journal of Clinical Oncology** 24.

Kewley, R. J., Whitelaw, M. L., Chapman-Smith, A. 2004. The Mammalian Basic helix-loop-helix/PAS Family of Transcriptional Regulators. **International Journal of Biochemistry Cell Biology** Vol. 36 pp. 189-204.

Kelecom, A. 1999. Chemistry of Marine Natural Products: Yesterday, Today and Tomorrow. **An. Acad. Bras. Cienc.** Vol. 71 pp. 249-263.

Kobayashi, M., S. Aoki, K. Gato, K. Matsunami, M. Korusu, I. Kitagawa. 1994. Marine Natural Product, XXXIV. Trisindoline, A New Antibiotic Indole Trimer, Produced by Bacterium of *Vibrio* Sp. **J. Chem. Pharm. Bull.** Vol. 42. (12): 2449-2451.

Kobayashi, N., Karisola, P., Peña-Cruz, V., Dorfman, D. F., Jinushi, M., Umetsu, S. E., Butte, M. J., Nagumo, H., Chernova, I., Zhu, B. et. al. 2007. TIM-1 and TIM-4 Glycoproteins Bind Phospatydlserine and Mediate Uptake of Apoptotic Cells. **Journal of Immunity** Vol. 27 pp. 927-940.

Koff, J. L., Ramachandiran, S., Bernal-Mizrachi, L. 2015. A Time to Kill: Targeting Apoptosis in Cancer. **International Journal of Molecular Science** Vol. 16 pp. 2942-2955.

Kraal, G., van der Laan, L. J. W., Elooma, O., Tryggvason, K. 2000. The Macrophage Receptor MARCO. **Journal of Microbes and Infection** Vol. 2 pp. 313-316.

Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K., Vandenabeele, P. 2008. Apoptosis and Necrosis: Detection, Discrimination and Phagocytosis. **Methods Journal** Vol. 44 pp. 205-221.

Lauber, K., Bohn, E., Kröber, S. M., Xiao, Y. J., Blumenthal, S. G., Lindemann, R. K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S. 2003. Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes

via Caspase-3-mediated Release of a Lipid Attraction Signal. **Cell Journal** Vol. 113 pp. 717-730.

Lei, H., Wang, X., Wu, C. 2012. Early Stage Intercalation of Doxorubicin to DNA Fragments Observed in Molecular Dynamics Binding Simulations. **Journal of Molecular Graphics and Modelling** Vol. 38 pp. 279-289.

Li, X., Liu, M., Sun, R., Zeng, Y., Chen, S., Zhang, P. 2017. Cardiac Complications in Cancer Treatment – A Review. **Hellenic Society of Cardiology** Vol. 58 pp. 190-193.

Lu, Y., Yeh, W., Ohashi, P. S. 2008. LPS/TLR4 Signal Transduction Pathway. **Journal of Cytokine** Vol. 42 pp. 145-151.

Makino, K., Nakajima, T., Shikamura, M., Ito, F., Ando, S., Kochi, C., Inagawa, H., Soma, G.-I., and Terada, H. 2003. Efficient intracellular delivery of rifampicin to alveolar macrophages using rifampicin-loaded PLGA microspheres: effects of molecular weight and composition of PLGA on release of rifampicin. **Colloid and Surf B: Biointerfaces** 36 pp. 35-42.

Makino, K., Tabata, J., Yoshioka, T., Fukuda, M., Ikeita, M., Ohshima, H., and Terada, H. 2003. Effects of liposomal phosphatidylserine on phagocytic uptake of liposomes by macrophage-like HL-60RG cells. **Colloid Surf B: Biointerfaces** 29 pp. 277-284.

Meier, P., Finch, A., Evan, G. 2000. Apoptosis in Development. **Nature Journal** 407 pp. 796-801.

Meurer, S. K., Nesß, M., Weiskirchen, S., Kim, P., Tag, C. G., Kauffman, M., Huber, M., Weiskirchen, R. 2016. Isolation of Mature (Peritonium-Derived) Mast Cells and Immature (Bone

Marrow-Derived) Mast Cells Precursors from Mice. **Plos One Journal** Vol. 11 No. 6 pp. 1 – 16.

Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., and Nagata, S. 2007. Identification of Tim4 as a Phosphatidylserine Receptor. **Nature Journal** Vol. 450 pp. 435–439.

Muhammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H., Lin, L., Siegelin, M. D., Fimognari, C., Kumar, N. B., Dou, Q. P., Yang, H., Samadi, A. K., Russo, G. L., Spagnuolo, C., Ray, S. K., Chakrabarti, M., Morre, J. D., Coley, H. M. Honoki, K., Fujii, K., Georgakilas, A. G., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., Ashraf, S. S., Helferich, W. G., Yang, X., Boosani, C. S., Guha, G., Bhakta, D., Ciriolo, M. R., Aquilano, K., Chen, S., Mohammed, S. I., Keith, W. N., Bilsland, A., Halicka, D., Nowsheen, S., Azmi, A. S. 2015. Broad Targeting of Resistance to Apoptosis in Cancer. **Journal Semin. Cancer Biology** Vol. 35.

Muñoz, L. E., Peter, C., Hermann, M., Wesselborg, S., Lauber, K. 2010. Scent of Dying Cells: the Role of Attraction Signal in the Clearance of Apoptotic Cells and Its Immunological Consequences. **Autoimmun. Review Journal** Vol. 9 pp. 425-430.

Murata, T., Yamawaki, H., Yoshimoto, R., Hori, M., Sato, K., Ozaki, H., Karak, H., 2001. Chronic Effect of Doxorubicin on Vascular Endothelium Assessed by Organ Culture Study. **Journal of Life Sciences** Vol. 69 page 2685-2695.

Murray, P. J., Wynn, T. A. 2011. Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets. **Nature Review of Immunology** Vol. 11.



Nakayama, M., Akiba, H., Takeda, K., Kojima, Y., Hashiguchi, M., Azuma, M., Yagita, H., and Okumura, K. 2009. Tim-3 Mediates Phagocytosis of Apoptotic Cells and Cross-presentation. **Blood** Vol. 113 pp. 3821–3830.

Negroni, A., Cucchiara, S., Stronati, L. 2015. Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis. **Journal of Mediators of Inflammation**.

Nicholson, D. W. 1999. Caspase Structure, Proteolytic Substrates, and Function during Apoptotic Cell Death. **Cell Death Differ.** 6 pp. 1028-1042.

Pal, R. 2013. New Greener Alternative for Biocondensation of Aldehydes and Indoles Using Lemon Juice: Formation of bis-, tris-, and Tetraindoles. **International Journal of Organic Chemistry** Vol. 3 pp. 136-142.

Park, D., Hochreiter-Hufford, A., and Ravichandran, K.S.. 2009. The Phosphatidylserine Receptor TIM-4 does not Mediate Direct Signaling. **Curr. Biol.** Vol. 19 pp. 346–351.

Park, D., Tosello-Tramont, A.C., Elliott, M.R., Lu, M., Haney, L.B., Ma, Z., Klivanov, A.L., Mandell, J.W., and Ravichandran, K.S. 2007. BAI1 is an Engulfment Receptor for Apoptotic Cells Upstream of the ELMO/Dock180/Rac Module. **Nature Journal** Vol. 450 pp. 430–434.

Park, S.Y., Jung, M.Y., Kim, H.J., Lee, S.J., Kim, S.Y., Lee, B.H., Kwon, T.H., Park, R.W., and Kim, I.S. 2008. Rapid Cell Corpse Clearance by Stabilin-2, a Membrane Phosphatidylserine Receptor. **Cell Death Differ.** Vol. 15 pp. 192–201.

Parnaik, R., Raff, M. C., Scholes, J. 2000. Difference Between the Clearance of Apoptotic Cells by Professionals and Non-

professionals Phagocytes. **Journal of Current Biology** Vol. 10 pp. 857-860.

Patel, A. G., Kaufmann, S. H. 2012. How does Doxorubicin Work? **eLife Insight Journal: Cancer** pp. 1-3.

Paul, D., Achouri, S., Yoon, Y., Herre, J., Bryant, C. E., Cicuta, P. 2013. Phagocytosis Dynamics Depends on Target Shape. **Biophysical Journal** Vol. 105.

Pertiwi, Lintang. 2017. **Uji Sitotoksisitas Kelompok Senyawa Trisindolina terhadap MCF 7 cell line**. Skripsi S1. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu dan Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

Pettit, G. R., Tan, R., Chicacz, Z. A. 2005. Isolation and Structure of Sisterstatin 6 from Indian Ocean *Hyrtios erecta*. **Journal of Nat. Prod.** Vol. 68 pp. 1253-1255.

Qiu, Y., Deng, Z., Pei, Y., Fu, H., Li, J., Proksh, P., Lin, W. 2004. Sesterpoids from the Marine Sponge *Hyrtios erecta*. **Journal of Natural Product** Vol. 67. Pp. 921-924.

Rosland, G. V., Engelsen, A. S. T. 2015. Novel Points of Attack for Targeted Cancer Therapy. **Journal of Basic Clinical Pharmacology and Toxicology** 116.

Salman, A. S., Mahmoud, N. A., Abdel-Aziem, A., Mohamed, M. A. Elsis, D. M. 2015. Synthesis, Reactions and Antimicrobial Activity of Some New 3-Substituted Indole Derivatives. **International Journal of Organic Chemistry** 5.

Santos, R. L., Tsolis, R. M., Bäuml, A. J., Adams, L. G. 2003. Pathogenesis of Salmonella-induced Enteritis. **Braz Journal of Medical Biological Sciences** Vol. 36 pp. 3-12.

Sembulingan, K., Sembulingan, Prema. 2012. **Essentials of Medical Physiology Sixth Edition**. Bangladesh: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. ISBN: 978-93-5025-936-8.

Segawa, K., Suzuki, J., Nagata, S. 2011. Constitutive Exposure of Phosphatidylserine on Viable Cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** Vol. 108 pp. 19246-19251.

Silva, M. T., Coreia-Neves, M. 2012. Neutrophil and Macrophage: The Main Partners of Phagocyte Cell System. **Journal of Frontiers of Immunology** Vol. 3.

Stejskalova, L., Dvorak, Z., Pavek, P. 2011. Endogenous and Exogenous Ligands of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR): Current State of Art. **Journal of Current Drug Metabolism** Vol. 12 pp. 198-212.

Sub, S. F., Pan, Q. Z., Hui, X., Zhang, B. L., Wu, H. M., Li, H., Xu, W., Zhang, Q., Li, J. Y., Deng, X. M., Chen, J. W., Lian, Z. X., Li, N. 2008. Stronger in-vitro Phagocytosis by Monocytes-macrophage is Indicative of Greater Pathogen Clearance and Antibody Levels in-vivo. **Journal of Immunology, Health and Disease** Vol. 87 pp. 1725-1733.

Thomas, T. R. A., Kavlekar, D. P., Bharathi, P. A. L. 2010. Marine Drugs from Sponge-Microbe Association – A Review. **Journal of Marine Drugs** Vol. 8.

Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., Altman, R. B. 2011. Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effect. **Journal of Pharmacogenet Genomics** 21(7).

Tizard, I. R. 1988. **Immunology: An Introduction**. New York: W. B. Saunders Company.

Tricarico, P. M., Marcuzzi, A., Piscianz, E., Monasta, L., Crovella, S., Kleiner, G. 2013. Mevalonate Kinase Deficiency And Neuroinflammation: Balance Between Apoptosis and Pyroptosis. **International Journal of Molecular Science** Vol. 14 pp. 23274-23288.

Truman, L. A., Ford, C. A., Pasikowska, M., Pound, J. K., Wilkinson, S. J., Dumintriu, I. E., Melville, L., Melrose, L. A., Ogden, C. A., Nibbs, R. et. al. 2008. CX<sub>3</sub>CL1/fractalkine is Released from Apoptotic Lymphocytes to Stimulate Macrophage Chemotaxis. **Blood Journal** Vol. 112 pp. 5026-5036.

Van den Eijnde, S. M., van den Hoff, M. J., Reutelingsperger, C. P., van Heerde, W. L., Henfling, M. E., Vermeji-Keers, C. et. al. 2001. Transient Expression of Phosphatidylserine at Cell-cell Contact Areas is Required for Myotube Formation. **Journal Cell Sci.** Vol. 114 (Part 20) pp. 3631-3642.

Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C. J., Brunk, U. T., Declercq, W., Vandenabeele, P. 2010. Necroptosis, Necrosis, and Secondary Necrosis Converge on Similar Cellular Disintegration Features. **Journal of Cell Death Differ.** Vol. 17 pp. 922-930.

Vander Heiden, M. G., Thompson, C. B. 1999. Bcl-2 Proteins: Regulators of Apoptosis or of Mitochondrial Homeostasis. **Nature Cell Biolog.** 1 E209-E216.

Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W., Vandenabeele, P. 1998. Dual Signaling of the Fas Receptor: Initiation Both Apoptotic and Necrotic Cell Death Pathways. **Journal of Exp. Med.** 188 pp. 919-930.

Wu, W., Liu, P., Li, J. 2012. Necroptosis: An Emerging Form of Programmed Cell Death. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** Vol. 82 pp. 249-258.

Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., Henikoff, S. 2014. Doxorubicin, DNA Torsion and Chromatin Dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta Journal** pp. 84-89.

Yoo, M. Choi, S. Young, K. Hwang, G. Chang, J. Kim, D. Zylstra, G dan Kim, E. 2008. Trisindoline Synthesis and Anticancer Activity. **Biochemical and Biophysical Research Communication** 376 : 96-99.

Youle, R. J., Strasser, A. 2008. The Bcl-2 Protein Family: Opposing Activities that Mediates Cell Death. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology** Vol. 9 pp. 47-59.

Yulinery, T., Nurhidayat, N. 2012. Penggunaan Ekstrak Fermentasi Beras dari Beberapa Jenis *Monascus purpureus* untuk Aktivitas in vitro Fagositosis Sel Makrofag dan Polimorfonuklear Peritonium Mencit sebagai Immunomodulator. **Jurnal Berita Biologi** 11(2).

Zhang, X., Goncalves, R., Mosser, D. M. 2008. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. **Current Protocols in Immunology**.

## LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi medium Roswell-Park Memorial Institut (RPMI).

INGREDIENTS	mg/L
<i>Inorganic Salts</i>	
Calcium nitrate tetrahydrate	100.000
Glutathione reduced	1.000
Magnesium sulphate anhydrous	48.840
Phenol red sodium salt	5.300
Potassium chloride	400.000
Sodium chloride	6.000.000
Sodium phosphate dibasic anhydrous	800.000
<i>Amino Acids</i>	
Glycine	10.000
L-Arginine hydrochloride	241.000
L-Asparagine	50.000
L-Aspartic acid	20.000
L-Cystine dihydrochloride	65.200
L-Glutamic acid	20.000
L-Glutamine	300.000
L-Histidine hydrochloride monohydrate	20.960
L-Hydroxyproline	20.000
L-Isoleucine	50.000
L-Leucine	50.000
L-Lysine hydrochloride	40.000
L-Methionine	15.000
L-Phenylalanine	15.000
L-Proline	20.000
L-Serine	30.000
L-Threonine	20.000
L-Tryptophan	5.000

L-Tyrosine sodium salt	28.830
L-Valine	20.000

#### Vitamin

Choline chloride	3.000
D-Biotin	0.200
D-Ca-Pantothenate	0.250
Folic acid	1.000
Niacinamide	1.000
Pyridoxine hydrochloride	1.000
Riboflavin	0.200
Thiamine hydrochloride	1.000
Vitamin B12	0.005
i-Inositol	35.000
<u>p-Amino benzoic acid (PABA)</u>	<u>1.000</u>

#### Lampiran 2. Desain Uji Fagositosis Trisndolina-4 dan Doxorubicin

	1	2	3	4	5	6
A	100 µg/ml			6,25 µg/ml		
B	50 µg/ml			Kontrol		
C	25 µg/ml					
D	12,5 µg/ml					

#### Keterangan:

- A1: Senyawa T1 Konsentrasi 100 µg/ml Ulangan ke-1  
A2: Senyawa T1 Konsentrasi 100 µg/ml Ulangan ke-2  
A3: Senyawa T1 Konsentrasi 100 µg/ml Ulangan ke-3

- B1: Senyawa T1 Konsentrasi 50 µg/ml Ulangan ke-1  
 B2: Senyawa T1 Konsentrasi 50 µg/ml Ulangan ke-2  
 B3: Senyawa T1 Konsentrasi 50 µg/ml Ulangan ke-3  
 C1: Senyawa T1 Konsentrasi 25 µg/ml Ulangan ke-1  
 C2: Senyawa T1 Konsentrasi 25 µg/ml Ulangan ke-2  
 C3: Senyawa T1 Konsentrasi 25 µg/ml Ulangan ke-3  
 D1: Senyawa T1 Konsentrasi 12,5 µg/ml Ulangan ke-1  
 D2: Senyawa T1 Konsentrasi 12,5 µg/ml Ulangan ke-2  
 D3: Senyawa T1 Konsentrasi 12,5 µg/ml Ulangan ke-3  
 A4: Senyawa T1 Konsentrasi 6,25 µg/ml Ulangan ke-1  
 A5: Senyawa T1 Konsentrasi 6,25 µg/ml Ulangan ke-2  
 A6: Senyawa T1 Konsentrasi 6,25 µg/ml Ulangan ke-3  
 B4: Kontrol Ulangan ke-1  
 B5: Kontrol Ulangan ke-2  
 B6: Kontrol Ulangan ke-3

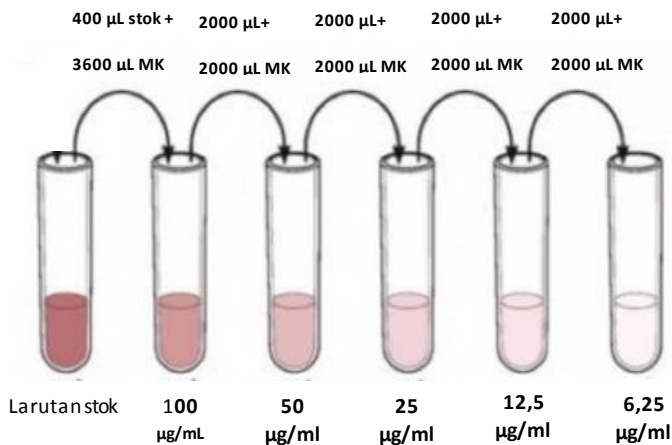
### Lampiran 3. Perhitungan Pengenceran Senyawa

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1. 1.000 \mu\text{g/mL} = 4.000 \mu\text{L}. 100\mu\text{g/mL}$$




$$V1 = \frac{4.000 \mu\text{L} \times 100 \mu\text{g/mL}}{1.000 \mu\text{g/mL}}$$


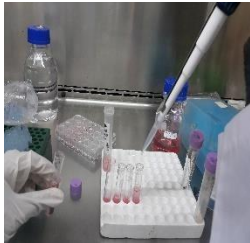

$$V1 = 400 \mu\text{L} + 3600 \mu\text{L MK}$$



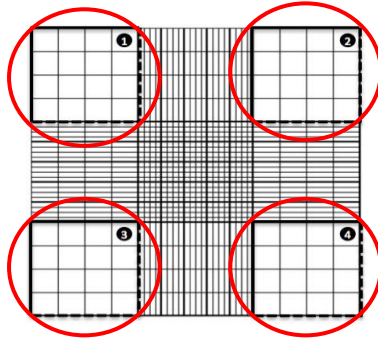


## Lampiran 5. Alat, Bahan dan Cara Kerja

No	Gambar	Keterangan
1.		Mencit 8 minggu
2.		Medium RPMI dalam syringe untuk mengambil peritonium makrofag
3.		Alkohol

5.		Proses pengambilan peritoneal makrofag
6.		Proses pembuatan senyawa uji setiap konsentrasi Dengan penambahan media kultur
7.		Proses pewarnaan cover slips dan proses pencucian

## Lampiran 6. Cara Menghitung Kepadatan Sel Makrofag dalam Kultur



Perhitungan jumlah sel dilakukan pada 4 bidang Ruang W kemudian dihitung dengan rumus :

$$\frac{\text{Jumlah sel dalam 4 bilik hitung} \times 10000 \text{ sel/ml}}{4}$$

Total sel/mL dihitung dengan rumus :

$$\frac{\Sigma \text{ well (100)} \times \Sigma \text{ sel yang dibutuhkan (10.000)}}{\Sigma \text{ sel yang dihitung}}$$

Lampiran 7. Tabel Hasil Uji ANOVA Kapasitas dan Indeks Fagositosis Sel Makrofag *M. musculus* dengan Perlakuan Senyawa Trisindolina-4

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kapasitas	Between Groups	409.511	5	81.902	3.582	.033
	Within Groups	274.413	12	22.868		
	Total	683.924	17			
Indeks	Between Groups	.341	5	.068	1.031	.442
	Within Groups	.793	12	.066		
	Total	1.133	17			

Lampiran 8. Tabel Hasil Uji ANOVA Kapasitas dan Indeks Fagositosis Sel Makrofag *M. musculus* dengan Perlakuan Doxorubicin.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kapasitas	Between Groups	960.837	5	192.167	10.384	.000
	Within Groups	222.077	12	18.506		
	Total	1182.914	17			
Indeks	Between Groups	6.701	5	1.340	11.773	.000
	Within Groups	1.366	12	.114		
	Total	8.067	17			

Lampiran 9. Hasil Uji Tukey Nilai Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag dengan Perlakuan Trisindolina-4.

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
25.00	3	17.3333	
.00	3	20.6667	20.6667
12.50	3	21.8900	21.8900
100.00	3	23.3333	23.3333
6.75	3	23.4433	23.4433
50.00	3		32.8900
Sig.		.634	.073

Lampiran 10. Tabel Hasil Uji Tukey Indeks Fagositosis Sel Makrofag dengan Perlakuan Trisindolina-4.

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05
		1
.00	3	1.7967
100.00	3	1.8233
50.00	3	1.9233
6.75	3	1.9533
12.50	3	1.9967
25.00	3	2.2167
Sig.		.395





Lampiran 11. Hasil Uji Tukey Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag dengan Perlakuan Doxorubicin.

konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
100.00	3	.9367	
50.00	3	3.5233	
6.75	3	9.1100	9.1100
12.50	3		15.6400
25.00	3		17.7067
.00	3		20.6667
Sig.		.255	.056

Lampiran 12. Hasil Uji Tukey Indeks Fagositosis Sel Makrofag dengan Perlakuan Doxorubicin.

konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
100.00	3	.0223	
50.00	3	.0696	
25.00	3	.3747	
6.75	3	.4106	
12.50	3	.9163	.9163
.00	3		1.7967
Sig.		.060	.066

### Lampiran 13. *Ethical Clearance* Penelitian di Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

	<b>MEDICAL AND HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE (MHREC)</b> <b>FACULTY OF MEDICINE GADJAH MADA UNIVERSITY</b> <b>- DR. SARDJITO GENERAL HOSPITAL</b>	
<b>ETHICS COMMITTEE APPROVAL</b>		
Ref : KE/FK/ <u>1119</u> /EC/2017		
Title of the Research Protocol :	Uji <i>In-Vitro</i> Senyawa Antikanker Trisindolina-4 pada Sel Makrofag Mencit ( <i>Mus Musculus</i> )	
Documents Approved :	Study Protocol versi 02 2017	
Principle Investigator :	Zulfina Qurotul Aini	
Name of supervisor :	1. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si 2. Prof. Mardi Santoso, Ph.D	
Date of Approval :	<b>19 OCT 2017</b> (Valid for one year beginning from the date of approval)	
Institution(s)/place(s) of research :	Laboratorium Farmakologi FK UGM	
<p>The Medical and Health Research Ethics Committee (MHREC) states that the above protocol meets the ethical principle outlined in the Declaration of Helsinki 2008 and therefore can be carried out.</p> <p>The Medical and Health Research Ethics Committee (MHREC) has the right to monitor the research activities at any time.</p> <p>The investigator(s) is/are obliged to submit:</p> <p><input type="checkbox"/> Progress report as a continuing review : Annually</p> <p><input type="checkbox"/> Report of any serious adverse events (SAE)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Final report upon the completion of the study</p>		
 Prof. Dr. dr. Sri Sutarni, Sp.S(K) Chairperson	 Dr. dr. Eti Nurwening Sholikhah, M.Kes., M.Med.Ed Secretary	
Attachments: <input type="checkbox"/> Continuing review submission form (AF 4.3.01-014.2013-03) <input type="checkbox"/> Serious adverse events (SAE) report form (AF 6.1.01- 019.2013-03)		
Recognized by Forum for Ethical Review Committees in Asia and the Western Pacific (FERCAP) 17-Oct-17		

## BIODATA PENULIS



Penulis yang bernama lengkap Zulfina Qurotul Aini, merupakan anak dari pasangan Damanuri dan Munasikah yang lahir di Blitar pada tanggal 9 Oktober 1995. Penulis menempuh pendidikan di TK Bustanul Muta'alimin, SDN Pagerwojo 2, MTs Negeri Jabung Blitar dan SMA Negeri 1 Garum Blitar dan berhasil masuk ke Departemen Biologi Institut Teknologi

Sepuluh Nopember dengan jalur seleksi SNMPTN pada tahun 2014. Prestasi yang berhasil diarah sejauh ini adalah termasuk ke dalam salah satu anggota tim dalam PKM-P berjudul '*Laccase Mediators System: Penggunaan Laccase dengan Variasi Mediator untuk Degradasi Minyak Mentah (Crude Oil) Kontaminan Tanah di Pertambangan Cepu Indonesia*' yang berhasil didanai pada tahun 2015, termasuk salah satu kontributor dalam buku kumpulan kisah mahasiswa penerima beasiswa Bidik Misi ITS tahun 2016 berjudul '*Sepenggal Perjalanan Menuju Asa*'. Untuk keperluan korespondensi, penulis dapat dihubungi melalui email [zulfina09@gmail.com](mailto:zulfina09@gmail.com).